

# **Die Regulation des nucleären Kalziumtransienten in ventrikulären Kardiomyozyten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Tobias-Oliver Kiess**

aus Salzgitter

Marburg/Lahn 2019

Erstgutachter: **Prof. Dr. Jens Kockskämper**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Moritz Bünemann**

Eingereicht am **08.03.2019**

Tag der mündlichen Prüfung am **03.05.2019**

Hochschulkennziffer: 1180

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der

Philipps-Universität Marburg

<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer

Creative Commons Namensnennung

Keine kommerzielle Nutzung

Keine Bearbeitung

4.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,  
das Erforschliche erforscht zu haben und  
das Unerforschliche zu verehren.

Johann Wolfgang von Goethe



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Vorwort .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen kardialer Funktionen .....</b>	<b>02</b>
1.1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion des Herzens .....	02
1.1.2 Gefäße, Blutzirkulation und Herzaktion .....	04
1.1.3 Herzerregung und vegetative Innervation .....	05
1.1.4 Mikroskopischer Aufbau des Herzens .....	07
<b>1.2 Cytoplasmatische Kalziumregulation in Kardiomyozyten .....</b>	<b>09</b>
1.2.1 Die Rolle des Kalziums in der Herzmuskelzelle .....	09
1.2.2 Die elektromechanische Kopplung .....	10
1.2.2.1 Das Aktionspotenzial: Die elektrische Erregung der Herzmuskelzelle .....	11
1.2.2.2 Der cytoplasmatische Kalziumtransient .....	13
1.2.2.3 Kalziumanstieg im Cytoplasma .....	14
1.2.2.4 Disinhibition der Myofilamente: Aktivierung des Querbrückenzyklus .....	16
1.2.2.5 Kalziumabfall im Cytoplasma und Relaxation des Kardiomyozyten	17
1.2.3 Die Rolle des sarkoplasmatischen Retikulums .....	19
1.2.4 Modulation der Herzleistung auf zellulärer Ebene .....	21
<b>1.3 Nucleäre Kalziumregulation in Ventrikelmyozyten .....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Bedeutung von Kernkalzium: Die Erregungs-Transkriptions-Kopplung ...	24
1.3.2 Ca-regulierende Proteine und die Kernhülle .....	25

<b>1.4 Klinische Bedeutung des Kernkalziums</b>	27
1.4.1 Die Rolle des Kalziums bei der Regulation der Transkription und der Vermittlung prohypertropher Signalwege	27
1.4.2 Kardiale Umbauvorgänge in der Pathogenese der Hypertrophie	32
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit</b>	34
<b>2 Material und Methoden</b>	35
2.1 Versuchstiere	35
2.1.1 Physiologisches Tiermodell	35
2.1.2 Pathologisches Tiermodell	35
<b>2.2 Chemische Substanzen</b>	36
2.2.1 Pharmakologisch aktive Substanzen	37
2.2.1.1 Isoprenalin	37
2.2.1.2 Koffein	38
2.2.1.3 Thapsigargin	40
<b>2.3 Isolierung von ventrikulären Rattenmyozyten</b>	42
2.3.1 Puffer und Lösungen	42
2.3.1.1 Basispuffer	42
2.3.1.2 Kardioplegielösung	43
2.3.1.3 Kanülierungslösung	44
2.3.1.4 Kalziumfreie Lösung	44
2.3.1.5 Enzymlösung	45
2.3.1.6 Stopp-Lösung	46
2.3.1.7 Kalziumlösungen	47
2.3.2 Grundlagen der retrograden Herzperfusion am Langendorff-System	48

2.3.3	Myozytenisoliationsverfahren .....	49
2.3.4	Ausplattieren der isolierten Kardiomyozyten .....	51
<b>2.4</b>	<b>Kalzium-Imaging am Konfokalmikroskop .....</b>	<b>52</b>
2.4.1	Grundlagen der Kalziummessungen mit Fluoreszenzindikatoren .....	52
2.4.2	Beladung der Myozyten mit Fluo-4/AM .....	55
2.4.3	Konfokales Imaging von subzellulären Kalziumtransienten .....	58
2.4.3.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop .....	58
2.4.3.2	Aufnahme subzellulärer Kalziumtransienten in Ventrikelmyozyten	60
2.4.4	Auswertung der konfokalen Messungen .....	62
2.4.5	Messung von Kalziumbeladung und -freisetzung aus dem SR und den perinucleären Speichern .....	63
<b>2.5</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>63</b>
2.6	Datenaufbereitung und Design der Arbeit .....	64
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Studien am physiologischen Modell .....</b>	<b>65</b>
3.1.1	<b>Effekte von erniedrigten cytoplasmatischen Ca-Konzentrationen auf den nucleären CaT .....</b>	<b>65</b>
3.1.1.1	Änderung des cytoplasmatischen CaT durch Verminderung der extrazellulären Ca-Konzentration .....	65
3.1.1.2	Die Verringerung des cytoplasmatischen CaT führt zu einer Verkleinerung des nucleären CaT .....	67
3.1.2	<b>Effekte von erhöhten cytoplasmatischen Ca-Konzentrationen auf den nucleären CaT .....</b>	<b>69</b>
3.1.2.1	Modulation des cytoplasmatischen CaT durch Stimulation β-adrenerger Rezeptoren .....	69
3.1.2.2	Zeitabhängiger Effekt der Isoprenalin-Applikation .....	70

3.1.2.3	Die Erhöhung des cytoplasmatischen CaT führt zu einer Vergrößerung des nucleären CaT .....	71
<b>3.1.3</b>	<b>Modulation der nucleären Ca-Regulation mittels Hemmung der SERCA-Pumpe .....</b>	<b>73</b>
3.1.3.1	Effekte der Thapsigargin-Applikation .....	73
3.1.3.2	Zeitverlauf des Thapsigargin-Effekts und limitierende Faktoren .....	74
3.1.3.3	Erhöhung des diastolischen Ca und Verlangsamung des CaT in beiden Kompartimenten als Folge der SERCA-Inhibition .....	76
<b>3.1.4</b>	<b>Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Kalzium .....</b>	<b>77</b>
3.1.4.1	Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Ca in der Diastole .....	77
3.1.4.2	Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischen Ca in der Systole .....	80
3.1.4.3	Einfluss der SERCA-Aktivität auf das Kern-Cyto-Verhältnis .....	83
<b>3.1.5</b>	<b>Charakterisierung der intrazellulären Kalziumspeicher .....</b>	<b>85</b>
3.1.5.1	Beladung des SR und der perinucleären Kalziumspeicher .....	85
3.1.5.2	Fraktionelle Ca-Freisetzung aus dem SR und den perinucleären Kalziumspeichern .....	88
3.1.5.3	Die Rolle der perinucleären Kalziumspeicher für die Kernkalziumregulation .....	89
<b>3.2</b>	<b>Studien am Krankheitsmodell .....</b>	<b>91</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Auswahl der Zellen .....</b>	<b>92</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Modulation des cytoplasmatischen CaT und der SERCA-Aktivität in SHR-Ventrikeldmyozyten durch Isoprenalin .....</b>	<b>94</b>
3.2.2.1	Die Erhöhung des cytoplasmatischen CaT vergrößert den nucleären CaT in SHR-Ventrikeldmyozyten .....	94
3.2.2.2	Das Verhältnis von nucleärem und cytoplasmatischen Ca in SHR-Ventrikeldmyozyten .....	96

<b>3.2.3 Unterschiede in der Effektstärke von Isoprenalin zwischen WKY- und SHR-Ventrikeldmyozyten</b>	98
<b>4 Diskussion</b>	101
4.1 Methodische Aspekte der Studie	101
4.2 Der cytoplasmatische CaT bildet die Grundlage für den systolischen Ca-Anstieg im Nucleus	103
4.3 Die SERCA moduliert den systolischen Ca-Anstieg im Nucleus	106
4.4 Modell der nucleären Ca-Regulation	109
4.5 Die perinucleären Ca-Speicher spielen eine nachrangige Rolle für die nucleäre Ca-Regulation	111
4.6 Die Regulation des diastolischen Ca im Nucleus	114
4.7 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das SHR-Modell	117
4.8 Unterschiede zwischen den Tiermodellen	120
4.9 Konklusion	122
<b>5 Zusammenfassung</b>	123
<b>6 Summary</b>	126
<b>Literaturverzeichnis</b>	129
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	139
<b>Tabellenverzeichnis</b>	141
<b>Publikationen</b>	142
<b>Lebenslauf</b>	144
<b>Erklärung</b>	145

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adrenalin
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
$\alpha_1$ -R	$\alpha_1$ -Adrenozeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Aktionspotenzial
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse
AT <sub>1</sub> -R	Angiotensin-1-Rezeptor
AT-II	Angiotensin-II
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BAPTA	1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
BDM	2,3-Butandionmonoxim
Ca	Kalzium, Ca <sup>2+</sup> -Ionen
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Konzentration der intrazellulären, freien Ca <sup>2+</sup> -Ionen
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>SR</sub>	Konzentration der freien Ca <sup>2+</sup> -Ionen im Lumen des SR
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>SR,total</sub>	Gesamtkonzentration von freiem und gebundenem Ca im SR
CaM	Calmodulin
CaMKII( $\delta$ )	Ca-Calmodulin-abhängige Proteinkinase-II ( $\delta$ -Isoform)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaN	Calcineurin
CaT	Kalziumtransient
CICR	kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung (Ca-induced Ca release)
CTR	Kontrolle
Cyto/cyto	Cytoplasma/cytoplasmatisch
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBSL	Erregungsbildungs- und -leitungssystem
ECC	elektromechanische Kopplung (excitation-contraction coupling)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
ET <sub>A</sub> -R	Endothelin-A-Rezeptor
ETC	Erregungs-Transkriptions-Kopplung
F	systolisches Ca (Maximum der Fluoreszenzintensität im CaT)
F <sub>0</sub>	diastolisches Ca (Minimum der Fluoreszenzintensität im CaT)
FR	fraktionelle Freisetzung (fractional release)
F <sub>rest</sub>	Ruhe-Ca (Ruhefluoreszenz, ohne elektrische Stimulation)
dF	Amplitude des CaT
GATA4	Transkriptionsfaktor, nach der Basensequenz GATA benannt
G $\alpha_s$	G-Protein mit $\alpha$ -Untereinheit vom Typ G <sub>s</sub>
G $\alpha_q$	G-Protein mit $\alpha$ -Untereinheit vom Typ G <sub>q</sub>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor

G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Hydrochlorid
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
$I_{Ca,L}$	$Ca^{2+}$ -Ionen-Einstrom durch den Kalziumkanal vom L-Typ
INM	innere Kernmembran
$IP_3$	Inositol-1,4,5-trisphosphat
$IP_3$ -R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
ISO	Isoprenalin
i.v.	Intravenös
$K_d$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge
LTCC	Kalziumkanal vom L-Typ (L-type calcium channel)
MEF2	myocyte enhancer factor-2 (ein Transkriptionsfaktor)
M	Mol pro Liter
$M_r$	relative molekulare Masse
N.	Nervus
N/C	Kern-Cyto-Verhältnis
n. Chr.	nach Christus
NA	Noradrenalin
$Na_v$	spannungsabhängiger Natriumkanal
NCX	$Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher
NE	nuclear envelope (Kernhülle)
NES	Kern-Exklusions-Signal (nuclear exclusion signal)
NFAT	nuclear factor of activated T-cells (ein Transkriptionsfaktor)
NLS	Kern-Aufenthalts-Signal (nuclear localisation signal)
NPC	Kernporenkomplex
ns	nicht signifikant
Nuc/nuc	Nucleus/nucleoplasmatisch
ONM	äußere Kernmembran
P	Überschreitungswahrscheinlichkeit (Signifikanzwert)
$P_i$	Phosphatgruppe (anorganisch)
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PN	perinucleär
r	Rangkorrelationskoeffizient (nach Spearman)
RyR	Ryanodinrezeptor
S	Serin
SERCA	Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums
SHR	spontan-hypertensive Ratten
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T	Threonin
$\tau$	Abfallszeitkonstante (tau of decay)

TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
TG	Thapsigargin
TTP	Anstiegszeit (time to peak)
T-Tubuli	Transversaltubuli
V.	Vena
v. Chr.	vor Christus
Vv.	Venae
WKY	Wistar-Kyoto-Ratten



## Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde dem Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg im Wintersemester 2018/19 als Dissertationsschrift vorgelegt. Literatur konnte bis einschließlich Februar 2019 berücksichtigt werden. Ein Teil der zugrundeliegenden Daten wurde bereits in Kiess & Kockskämper (Frontiers in Physiology, 2019 Feb 6; 10:56.) veröffentlicht und Abbildungen, Ergebnisse und deren Beschreibung, sowie davon abgeleitete Schlussfolgerungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Die Zeit meiner Promotion neigt sich dem Ende zu und hinterlässt die vorliegende Dissertation als Produkt eines halben Jahrzehnts spannender Forschung und intensiver Arbeit. Zum Gelingen dieses Werkes haben viele Personen beigetragen, denen ich an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank aussprechen möchte.

Mein Doktorvater Herr Prof. Dr. Jens Kockskämper hat mich während meines gesamten Promotionsvorhabens herausragend betreut. Seit ich ihn im Jahr 2011 im Rahmen meines Pharmaziepraktikums kennengelernt habe, und während der letzten fünf Jahre als Mitarbeiter in seiner Arbeitsgruppe, durfte ich fachlich und persönlich sehr viel von ihm lernen. Hierfür und für seine uneingeschränkte Unterstützung bei all meinen Projekten bin ich ihm von Herzen dankbar.

Herrn Prof. Dr. Moritz Bünemann danke ich für die Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit. Seine klugen Fragen und Anregungen bei der regelmäßigen Präsentation meiner wissenschaftlichen Ergebnisse waren stets hilfreich und haben mir häufig neue Denkansätze geliefert.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Carsten Culmsee und Herrn Prof. Dr. Cornelius Krasel dafür danken, dass sie mir bei vielen Problemen mit ihrem Rat zur Seite standen und mir darüber hinaus das Mitwirken in verschiedenen Bereichen der pharmazeutischen Lehre ermöglichten und damit zu meiner persönlichen Entwicklung beigetragen haben.

Meine wunderbare Frau Franziska Kiess hat mich während meiner gesamten Arbeit und bei all meinen Projekten „nebenher“ in ihrer herzensguten Art mit aufopferungsvollem Engagement und schier unendlicher, apothekerlicher Fürsorge unterstützt. Sie hat mich in zahlreichen Krisen aufgefangen und mich stets motiviert mit neuem Mut und alter Kraft weiter an der Verwirklichung meiner Ziele und Träume zu arbeiten. Dafür bin ich ihr zutiefst dankbar. Ich bin überzeugt, dass ich ohne sie niemals so weit gekommen wäre.

Ich möchte allen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie für die tolle Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere danke ich den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Jelena, Hauke, Julia und Victoria, sowie Yulia und Florentina, die mir als gute Doktoranden- und Postdoc-Kollegen in Erinnerung bleiben werden. Darüber hinaus bin ich den zahlreichen Medizinerdoktoranden, die unsere Gruppe bereichert haben, dankbar, dass sie immer wieder frischen Wind ins Labor gebracht haben und mit ihrem medizinischen Fachwissen stets einen wertvollen Beitrag zum hohen Niveau der Forschung und Lehre in unserem Institut geleistet haben.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie. Meine Geschwister Anna-Lisa und Maximilian und natürlich auch meine Eltern Horst und Martina Kiess haben mich auf meinem langen Bildungsweg vorbehaltlos und unermüdlich unterstützt. Insbesondere meinem Bruder Max möchte ich für die zahlreichen fachlichen Gespräche und die Korrektur meines Manuskripts danken. Den Bemühungen und der Weitsicht meiner Eltern ist es zu verdanken, dass ich meine akademische Laufbahn überhaupt erst eingeschlagen habe. Ohne meine Familie wäre ich nicht die Person geworden, die ich heute bin.

Marburg, im März 2019

Tobias-Oliver Kiess

# 1. Einleitung

*Das Herz der Lebewesen ist der Grundstock ihres Lebens, der Fürst ihrer aller, der kleinen Welt Sonne, von der alles Leben abhängt, alle Frische und Kraft ausstrahlt.*

William Harvey

Dem Herzen wurde bereits in der Antike eine zentrale Rolle zugeschrieben. Erste systematische Untersuchungen zu seiner Funktion im Blutkreislauf wurden vom Arzt und Philosophen Galenos von Pergamon (ca. 130-200 n. Chr.) durchgeführt. Seine Theorie zur Blutentstehung und -bewegung besagt, dass die Leber der Ort einer kontinuierlichen Blutproduktion sei und von ihr vermittelt über das Herz die zentrifugale (nicht zirkuläre!) Ausbreitung durch Arterien und Venen bis zu den Organen und der Körperperipherie ausgehe. Dabei sah er das Herz als eine Art Verteilerzentrum, welches das Blut erhitzt und mit *Spiritus vitalis* (Lebensgeist) anreichert, um es schließlich zu den Organen und ins Gehirn zu transportieren. Hier sollte nach Galen eine Umwandlung des *Spiritus vitalis* in *Spiritus animalis* (Seelengeist) erfolgen, wobei das Blut vollständig verbraucht wird und seine Abfallprodukte als Schweiß über die Haut ausgeschieden werden (Eckart, 2009).

Vorstellungen, wie die der antiken Blutbewegungstheorie von Galen, herrschten weiter bis in das Mittelalter vor und wurden erst in der frühen Neuzeit mit der Wiederentdeckung der wissenschaftlich fundierten Anatomie abgelegt. Dies war vor allem den Erkenntnissen des englischen Physiologen William Harvey (1578-1657) zu verdanken. Als mutiger Pionier widersprach er der antiken Blutbewegungstheorie (sowie der gesamten Humoralpathologie) und stellte die Hypothese auf, dass „der Schlag des Herzens eine fortgesetzte Kreisbewegung des Blutes bewirkt“ (Eckart, 2009). Mit dieser neuen Zirkulationstheorie begriff er das Herz erstmals in seiner Funktion als Pumpe, die einen Kreislauf erhält, und begründete damit unser modernes Verständnis des Herz-Kreislaufsystems.

Neue Methoden, die in den letzten 50 Jahren Einzug in die Laboratorien hielten, haben die modernen Naturwissenschaften und die Herz-Kreislaufforschung geprägt. Mit der

Einführung der Techniken der Elektrophysiologie, der Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie und den Mitteln der Gentechnologie haben Wissenschaftler heute die Möglichkeit, Strukturen und Prozesse bis auf die Ebene molekularer Zusammenhänge zu untersuchen.

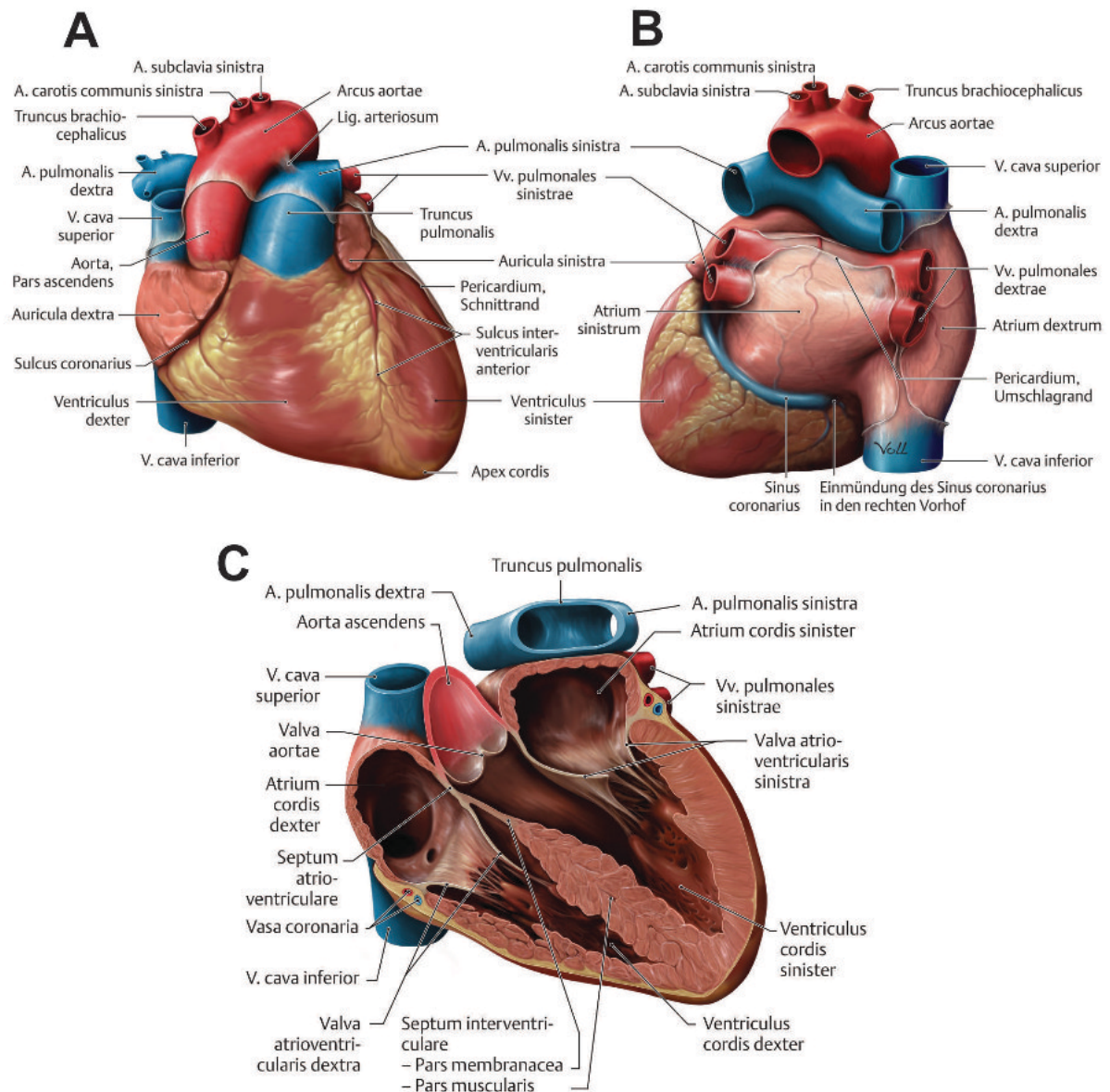
Die Funktion des Herzens mag auf den ersten Blick trivial erscheinen, doch birgt sie bei genauerer Betrachtung ein System fein aufeinander abgestimmter makroskopischer und mikroskopischer Komponenten und Abläufe. Viele dieser Abläufe unterliegen komplexen Regulationsmechanismen, deren Erforschung sich Wissenschaftler auf der ganzen Welt verschrieben haben. Trotz der großen Fortschritte, die auf diesem Gebiet in den letzten Jahrzehnten errungen wurden, sind diese Regulationsmechanismen in vielen Bereichen bis heute nicht bis ins letzte Detail verstanden. Einen dieser Bereiche stellt die nucleäre Kalziumregulation in Ventrikelfibrozyten dar, der Gegenstand dieser Arbeit ist.

## **1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen kardialer Funktionen**

### **1.1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion des Herzens**

Das Herz nimmt mit seiner Funktion eine elementare Rolle im Organismus ein. Als muskuläres Hohlorgan steht es im Zentrum des Blutkreislaufs und sorgt als Druck- und Saugpumpe für einen beständigen, rezirkulierenden Transport des Blutes. Das Herz ist topographisch im Thorax lokalisiert. Hier liegt es vom Herzbeutel (Perikard) umschlossen im mittleren Mediastinum. Es ähnelt dabei einem schräggestellten Kegel mit einer nach kranial orientierten Basis, über die das Organ fixiert ist, und einer nach kaudal gerichteten, frei beweglichen Spitze. Mit einer mittleren Masse von 300 g und einem durchschnittlichen Organvolumen von 785 ml unter physiologischen Bedingungen, lässt sich seine Größe bei einem Menschen anhand der Maße einer geschlossenen Faust des betrachteten Individuums abschätzen. Das Gewicht und Volumen sind dabei sehr vom Trainingszustand abhängig und können im Rahmen einer

physiologischen Hypertrophie bis zu einem gewissen Grad, dem sog. kritischen Herzgewicht von 500 g, zunehmen. Im Gegensatz dazu kann eine pathologische Hypertrophie zu deutlich höheren Herzgewichten führen.



**Abbildung 1-1 Makroskopische Anatomie des Herzens**

(A) Ansicht von ventral, (B) Ansicht von dorsal, (C) Vierkammerschnitt des Herzens.

(modifiziert nach Aumüller et al., 2014)

Funktionell lässt sich das Organ in ein linkes und rechtes Herz unterteilen. Das rechte Herz dient hierbei als Pumpstation für den Lungenkreislauf, wohingegen das linke Herz diese Funktion für den Körperkreislauf übernimmt. Makroskopisch gliedert sich das Herz in vier Binnenräume (Abb. 1-1), welche durch Septen und Klappen voneinander getrennt werden, um auf diese Weise einen gerichteten Transport des Blutes zu gewährleisten. So besitzt das linke wie auch das rechte Herz jeweils einen Vorhof (Atrium) und eine Kammer (Ventrikel), welche durch abwechselnde Anspannung (Kontraktion) und Erschlaffung (Relaxation) die Pumpfunktion ermöglichen. Die Atria haben die Aufgabe, das Blut aus dem jeweils vorgeschalteten Gefäß aufzunehmen und in die Ventrikel zu befördern, während mit Hilfe der Ventrikel das Blut in das jeweils nachgeschaltete Gefäß ausgeworfen wird.

### 1.1.2 Gefäße, Blutzirkulation und Herzaktion

Bei der Betrachtung der Gefäße im und am Herzen wird unterschieden zwischen einerseits den Gefäßen zur Eigenversorgung des Organs (*Vasa privata*), zu denen die Koronararterien (und im weiteren Sinne auch die Koronarvenen) zählen, und andererseits den Gefäßen zum Bluttransport mit dem Zweck der Versorgung des gesamten Körpers (*Vasa publica*). Beschreibt man letztgenannte entlang der physiologischen Fließrichtung des Blutes, beginnen diese mit der oberen und unteren Hohlvene (*Vv. cavae superior et inferior*), die das sauerstoffarme Blut aus dem Körperkreislauf sammeln und zum Herzen führen, wo sie in das rechte Atrium einmünden. Von hier aus gelangt das Blut über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Nach dessen Kontraktion passiert das geförderte Blutvolumen die Pulmonalklappe und gelangt über die Lungenstammarterie (*Truncus pulmonalis*) in die rechte und linke Lungenarterie (*Aa. pulmonales dextra et sinistra*), die das Blut weiter im Lungenkreislauf transportieren. Der Lungenkreislauf zeichnet sich durch deutlich niedrigere Drücke im Vergleich zum Körperkreislauf aus und dient der Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff aus der Atemluft in den Alveolen der Lungen. Nach der Passage des alveolären Kapillarbettts strömt das sauerstoffreiche Blut über die Lungenvenen (*Vv. pulmonales*, i.d.R. vier Stück) zurück zum Herzen, wo es vom linken Atrium aufgenommen wird. Über die Mitralklappe (Bikuspidalklappe) gelangt es nun

in den linken Ventrikel, der Anschluss an die Hauptschlagader (Aorta) hat. In der Systole befördert der linke Ventrikel das Auswurfvolumen über die Aortenklappe in die Aorta, welche das letzte und größte *Vas publicum* darstellt (Aumüller et al., 2014).

Die Herzklappen sind in einer bindegewebigen Faserplatte, der Ventilebene, verankert und sorgen als funktionelle Ein-Weg-Ventile für einen anterograden Blutfluss und zusammen mit der koordinierten Kontraktion und Relaxation der Atria und Ventrikel für eine funktionierende Herzaktion. Die Herzaktion lässt sich in eine Anspannungsphase (Systole) und Erschlaffungsphase (Diastole) unterteilen. In der Systole wird das Blut durch die Kontraktion der Ventrikel in die großen arteriellen Gefäße, *Truncus pulmonalis* und Aorta, befördert, während in der Diastole die Herzkammern, durch ein Zusammenspiel aus bei der Relaxation entstehendem Unterdruck und der Kontraktion der Vorhöfe, erneut mit Blut aus dem venösen System befüllt werden.

### 1.1.3 Herzerregung und vegetative Innervation

Das Herz verfügt über ein eigenes Erregungsbildungs- und -leitungssystem (EBLS), um die stetige Abfolge von Kontraktion und Relaxation zu gewährleisten und zu koordinieren. Das EBLs ermöglicht dem Organ, unabhängig von einer äußeren Innervation, seine Pumpfunktion autonom auszuüben. Die Tätigkeit des EBSL wird zusätzlich vom vegetativen Nervensystem modifiziert, um die Herzfunktion wechselnden äußeren Bedingungen und den damit einhergehenden physiologischen Erfordernissen anzupassen. Dabei unterliegt das EBLs einer hierarchischen Organisation und setzt sich aus mehreren Zentren zusammen. Es beginnt mit dem Sinusknoten im rechten Atrium, der mit einer Erregungsbildungsfrequenz von 60-90/min das übergeordnete Zentrum bildet und als primärer Schrittmacher bezeichnet wird. Von ihm aus breitet sich die Erregung über das gesamte atriale Gewebe aus und führt zur Kontraktion der Vorhöfe. Dabei wird auch der Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) erregt, welcher sich auf der zur Kammer orientierten Seite des rechten Vorhofs befindet und mit einer Eigenfrequenz von 40-60/min ebenfalls eine Schrittmacherfunktion besitzt, die allerdings nur bei einem Ausfall des Sinusknotens



zum Tragen käme (sekundärer Schrittmacher). Die physiologische Funktion des AV-Knotens ist die verzögerte Erregungsweiterleitung in die Ventrikel, damit diese ausreichend Zeit haben für eine suffiziente diastolische Befüllung. Der atrioventrikuläre Übergang ist durch die Ventilebene fast vollständig elektrisch isoliert und erlaubt nur in einem kleinen Bereich die Überleitung der Erregung. Hier tritt das His-Bündel (nach dem Internisten Wilhelm His benannt) in das Kammerseptum ein und teilt sich in einen rechten und linken Kammerschenkel (Tawara-Schenkel), welche Richtung Herzspitze ziehen und über ihre terminalen Aufzweigungen, die feinen Purkinje-Fasern, die Erregung auf das Kammermyokard übertragen (Pape et al., 2014; Schmidt et al., 2007).

Sympathikus und Parasympathikus, die beiden antagonistisch wirkenden Anteile des vegetativen Nervensystems, haben modulierende Effekte auf die Herzfunktion. Die Aktivierung des Sympathikus führt zu einer Erhöhung der Schlagkraft (positiv inotroper Effekt), Zunahme der Herzfrequenz (positiv chronotroper Effekt), Beschleunigung der Überleitung (positiv dromotroper Effekt) und Steigerung der Erschlaffungsgeschwindigkeit (positiv lusitroper Effekt). In Summe führen diese Effekte zu einer vermehrten Auswurfleistung des Herzens und dienen somit der Abstimmung der Herzleistung auf einen erhöhten Sauerstoffbedarf der Gewebe. Bei Aktivierung des Parasympathikus werden durch die gleichzeitige zentrale Sympathikushemmung die beschriebenen Effekte antagonisiert und auf kardialer Ebene zusätzlich ein negativ chronotroper und dromotroper Effekt vermittelt, mit dem Zweck, das Herzen in eine Erholungsphase zu bringen. Die vegetative Innervation des Herzens geht vom *Plexus cardiacus* aus, einem Nervenplexus, in das sympathische und parasympathische Fasern einstrahlen. Der *Plexus cardiacus* erstreckt sich vom Aortenbogen und *Truncus pulmonalis* über die gesamte Herzbasis und folgt primär dem Verlauf der Koronararterien. Die sympathischen Fasern haben ihre Ursprungsneurone in den Rückenmarkssegmenten C8-Th6 und werden vornehmlich in den zervikalen Ganglien des paravertebralen Grenzstrangs umgeschaltet. Die parasympathischen Fasern entstammen Ästen des *N. vagus* (X. Hirnnerv), die auf unterschiedlicher Höhe als präganglionäre Fasern abgehen und in den *Ganglia cardiaca* direkt im *Plexus cardiacus* umgeschaltet werden (Aumüller et al., 2014).



### 1.1.4 Mikroskopischer Aufbau des Herzens

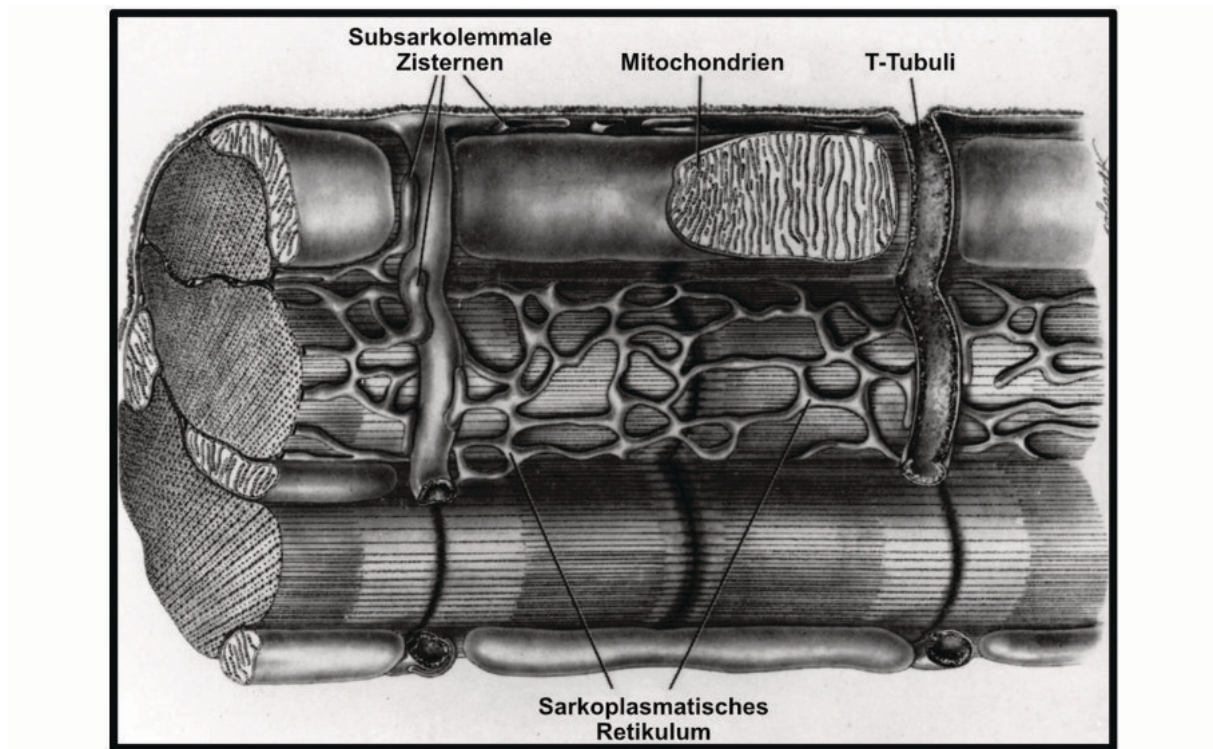
Als Hohlorgan besitzt das Herz einen typischen dreischichtigen Aufbau; der Herzbeutel sei an dieser Stelle außer Acht gelassen. Von außen nach innen unterscheidet man das Epikard, das Myokard und das Endokard. Das Endokard ist ein einschichtiges Plattenepithel, welches weitgehend dem Endothel der Blutgefäße entspricht und eine reibungsarme, athrombogene Oberfläche liefert, um einen optimalen Blutfluss zu gewährleisten. Das Endothel kleidet den gesamten Innenraum des Organs aus (inklusive der Klappen). Das außen liegende Epikard dient als bindegewebige Speicher- und Versorgungsschicht, die zu diesem Zweck Fettzellen als Energiedepots enthält und in der sich die größeren Blut- und Lymphgefäße, sowie Nervenfasern und Ganglien eingebettet finden. Das Myokard, die mittlere Schicht, beherbergt die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) und ist essenziell für die Kontraktionsfähigkeit und Pumpfunktion des Herzens. Hierfür enthalten die Kardiomyozyten filamentäres Aktin und Myosin (Myofilamente) als kontraktile Elemente (Aumüller et al., 2014).

Betrachtet man das Myokard im Lichtmikroskop, so lässt sich eine deutliche Querstreifung erkennen. Anders jedoch als die quergestreifte Skelettmuskulatur (oft nur als „quergestreifte Muskulatur“ bezeichnet) ist das Gewebe nicht in langen Muskelfasern organisiert, die auf Grund ihrer Entstehung (durch Verschmelzen einzelner Myoblasten) ein durchgehendes Cytoplasma aufweisen. Stattdessen finden sich im Herzen einzelne Kardiomyozyten von prismatischer Zellmorphologie, die in Faserzügen organisiert sind. Dabei werden über spezielle Haftkontakte (*Fasciae adherentes*) die Myofilamente benachbarter Zellen jeweils an den Z-Scheiben eines Aktins mit Hilfe von transmembranären Glykoproteinen (Cadherinen) über die Zellmembran hinaus zu einem funktionellen Synzytium miteinander verknüpft. Eine weitere Besonderheit der Kardiomyozyten besteht in dem Vorhandensein von Kommunikationskontakten, den Nexus (*gap junctions*). Hierbei handelt es sich um röhrenartige Zell-Zell-Kontakte, die über Transmembranproteine (Connexine) Verbindungskanäle zwischen den Myozyten schaffen. Diese Kanäle erlauben die Passage von Molekülen mit einer Größe von bis zu ~1 kDa. Damit können u.a. Ionenströme frei zwischen den Zellen fließen. Diese elektrische Koppelung ermöglicht die Weiterleitung

von Aktionspotenzialen und stellt die Grundlage der Erregungsausbreitung im Herzmuskelgewebe dar (Welsch & Deller, 2010).

Innerhalb des Myokards existieren unterschiedliche Zelltypen. So ist generell zwischen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten zu unterscheiden. Die im Vorhofmyokard zu findenden atrialen Myozyten weisen eine eher schlanke, spindelförmige Cytoarchitektur auf. Demgegenüber stehen die Ventrikelmyozyten aus dem Kammermyokard (Arbeitsmyokard), welche von deutlich dickerer Struktur sind und eine sichtbar größere Anzahl an Myofilamenten aufweisen. In den Ventrikelmyozyten finden sich weiterhin zahlreiche tiefe Einstülpungen der Plasmamembran (Sarkolemm), die von röhrenartiger Struktur sind und Transversaltubuli (T-Tubuli) genannt werden, da sie orthogonal zur Faserrichtung der Myozyten verlaufen. Die T-Tubuli stehen in unmittelbarem Kontakt mit dem dichten Netzwerk des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). In Kardiomyozyten bildet ein T-Tubulus zusammen mit einzelnen Terminalzisternen des SR (*junctional SR*) jeweils eine Diade aus (Bers, 2001). Durch diese besondere Konstruktion (Abb. 1-2) steht das Zellinnere mit dem extrazellulären Milieu in engem Kontakt. Eine Depolarisation der Zellmembran kann schnell und synchron ins Zellinnere gebracht werden, wo sie über die kurze Distanz zum SR unmittelbar in eine kalziumabhängige Signalkaskade überführt werden kann.

Es existieren darüber hinaus spezialisierte Kardiomyozyten im Myokard, die hier nur kurz erwähnt werden sollen. Dazu zählen die Zellen des EBLs, wie Sinus- und AV-Knoten-Zellen, die spontane Aktionspotentiale generieren können, oder wie die Zellen des His-Bündels und der Tawara-Schenkel, die zum Zwecke einer schnellen Erregungsleitung viele Nexus untereinander und kaum zu „normalen“ Kardiomyozyten ausbilden. Letztlich seien hier noch die endokrin aktiven Kardiomyozyten zu nennen, welche unter den kontraktilen Myozyten ultrastrukturell durch das Vorkommen elektronendichter Granula auffallen und in der Lage sind, auf einen Stimulus hin natriuretische Peptide freizusetzen.



**Abbildung 1-2 Ultrastruktur der Herzmuskelzelle**

Schematische Darstellung von Myofilamenten, Transversaltubuli (T-Tubuli) und sarkoplasmatischem Retikulum (SR) im Herzmuskel von Säugetieren. Erkennbar sind die Diaden, welche die Terminalzisternen des SR mit dem Sarkolemm an der Oberfläche und den T-Tubuli ausbilden.

(modifiziert nach Fawcett & McNutt, 1969)

## 1.2 Cytoplasmatische Kalziumregulation in Kardiomyozyten

### 1.2.1 Die Rolle des Kalziums in der Herzmuskelzelle

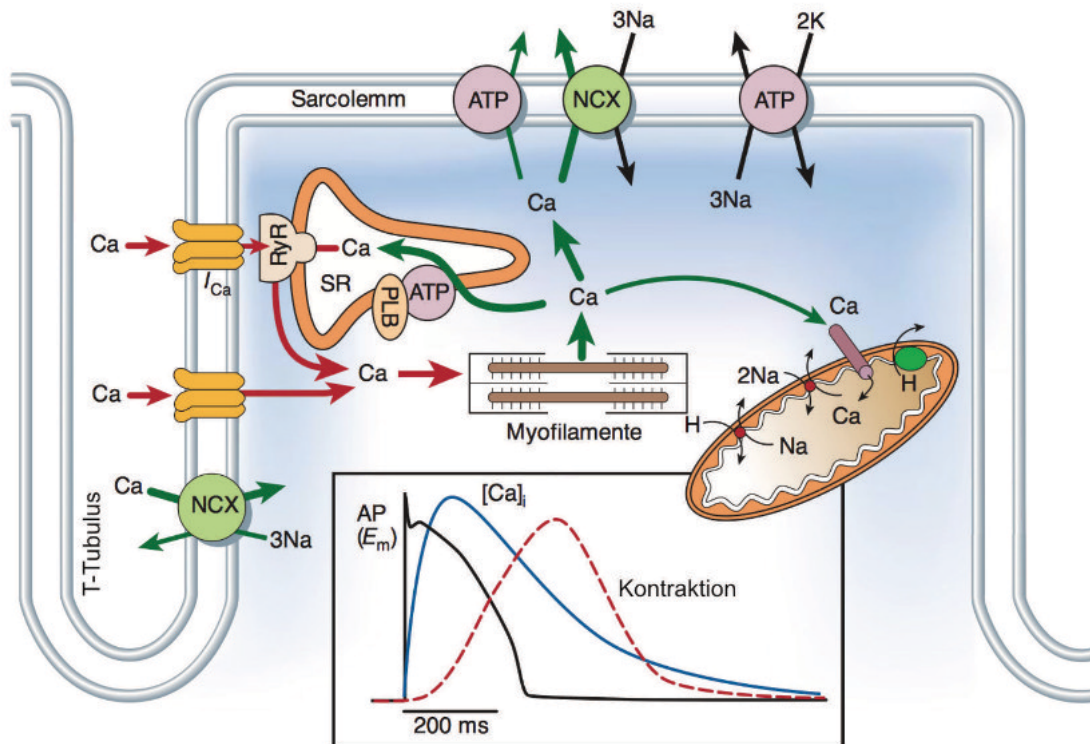
Kalzium kommt als Erdalkalimetall in einer Vielzahl von Verbindungen vor und ist ubiquitär auf der Erde verbreitet. In Form von in Wasser gelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Ca) kommt ihm in biologischen Systemen eine besondere Rolle zu. Hier stellt Ca einen äußerst vielseitigen Signalstoff (*second messenger*) dar, der in nahezu jedem Zelltyp spezifische Funktionen hat. So ist es an der Regulation wichtiger zellphysiologischer

Prozesse beteiligt, wie z.B. elektrischer Erregung, Metabolismus, Sekretion, Apoptose, Gentranskription oder dem Zellzyklus (Berridge et al., 2000; Bers, 2008). In Herzmuskelzellen stellt Ca darüber hinaus das Schlüsselement für die Kontraktion dar.

### 1.2.2 Die elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung (*excitation-contraction coupling*, ECC) beschreibt den Prozess, der die elektrische Erregung der Zellmembran mit der mechanischen Kontraktion der Myofilamente verknüpft. Jede Kontraktion der Herzmuskelzelle beginnt mit einem Aktionspotential, welches über die elektromechanische Kopplung mit Hilfe von Ca als Signalstoff letztendlich zur Verrichtung physikalischer Arbeit führt. Bei der elektrischen Erregung des Kardiomyozyten kommt es durch die Depolarisation der Zellmembran zur Öffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle vom L-Typ (LTCC) und konsekutivem Ca-Einstrom ( $I_{Ca,L}$ ). Der  $I_{Ca,L}$  trägt zur Plateau-Phase im Aktionspotenzial bei und liefert das Trigger-Ca zur Öffnung der Ryanodinrezeptoren (RyR) mit nachfolgender Ca-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dieser Vorgang wird als Ca-induzierte Ca-Freisetzung (*Ca-induced Ca release*, CICR) bezeichnet und ist ein Charakteristikum von Herzmuskelzellen (Fabiato & Fabiato, 1975; Kockskämper, 2016; Niggli & Lederer, 1990). Hier liegt ein bedeutender Unterschied im Vergleich zur Skelettmuskelzelle, in welcher die SR-Ca-Freisetzung spannungsabhängig durch das Aktionspotenzial und unabhängig vom Ca-Einstrom ausgelöst wird.

Die Kombination aus Ca-Einstrom und Ca-Freisetzung lässt die intrazelluläre Ca-Konzentration im Kardiomyozyten ansteigen, wodurch die Bindung von Ca an das Protein Troponin C ermöglicht wird (Bers, 2008) und in dessen Folge die Interaktion der Myofilamente die Sarkomere und letztlich die gesamte Zelle kontrahieren lässt (Abb. 1-3). Für eine halbmaximale Kontraktion bedarf es dabei einer Konzentration von ~600 nM freiem, intrazellulärem Ca (Bers, 2002).



**Abbildung 1-3 Elektromechanische Kopplung im Kardiomyozyten**

Illustration der elektromechanischen Kopplung in Ventrikeldmyozyten. Die Details und Abkürzungen werden im Text erläutert. Eingelassen findet sich die Darstellung des Zeitverlaufs eines Aktionspotenzials, des  $CaT$  und der Kontraktionskraft, gemessen in einem Kaninchenmyozyten bei 37°C.

(modifiziert nach Bers, 2002)

### 1.2.2.1 Das Aktionspotenzial: Die elektrische Erregung der Herzmuskelzelle

Am Beginn einer jeden Herzmuskelkontraktion steht die elektrische Erregung der einzelnen Herzmuskelzelle. Diese weist als elektrisch erregbare Zelle ein Membranpotenzial auf, welches auf einer Ungleichverteilung von Ladungen und Konzentrationsdifferenzen von Ionen zwischen dem Zellinneren und dem Extrazellularraum basiert, und durch die selektive Permeabilität der Plasmamembran eine zelltyp-spezifische



Ausprägung erfährt. Ventrikuläre (und auch atriale) Kardiomyozyten haben ein stabiles Ruhemembranpotenzial. Das Zellinnere ist gegenüber dem Außenraum negativ polarisiert, so dass über dem Sarkolemm eine transmembranäre Spannung von ca. -85 mV liegt. Dieses besonders niedrige Ruhemembranpotenzial liegt dicht beim Nernst-Gleichgewichtspotenzial für  $K^+$  (-90 mV), da das Sarkolemm unter Ruhebedingungen eine hohe Leitfähigkeit für  $K^+$ -Ionen und nur eine sehr geringe Leitfähigkeit für andere Ionenspezies aufweist. Dieses Ruhemembranpotenzial wird durch den sog.  $K^+$ -Einwärtsgleichrichter (Kir2.1,  $I_{K1}$ -Strom) erzeugt und stabilisiert, der bei niedrigem Membranpotenzial die höchste Leitfähigkeit besitzt (Pape et al., 2014; Schmidt et al., 2007).

Allgemein zeichnet sich das Aktionspotenzial von Kardiomyozyten gegenüber dem von anderen erregbaren Zellen (z.B. Skelettmuskelzellen) durch eine relativ lange Dauer von ~200-400 ms aus (Nerbonne & Kass, 2005). Die elektrische Erregung eines Ventrikelmuskelmyozyten läuft wie folgt ab: Das Membranpotenzial einer noch ruhenden Zelle wird von einer depolarisierten Nachbarzelle (EBLS-Zelle oder bereits erregter Myozyt) durch eine Ladungsverschiebung an der Oberfläche und entlang der Nexus auch im Zellinneren leicht angehoben. Wird hierbei das Schwellenpotenzial von ca. -70 mV erreicht, kommt es zur Öffnung der schnellen Natriumkanäle ( $Na_v1.5$ ) bei gleichzeitiger Inaktivierung des  $I_{K1}$ -Stroms. Die Folge ist ein  $Na^+$ -Einstrom ( $I_{Na}$ ) und der Aufstich (Phase 0) des Aktionspotenzials (AP) bis zu einem leicht positiven Wert von etwa +20 mV (*overshoot*). Da die Na-Kanäle ab einem Wert von etwa -40 mV rasch inaktiviert werden, ist der  $Na^+$ -Einstrom nach ca. 1 ms beendet, und es kommt zu einer frühen Repolarisation (Phase 1). Hierfür verantwortlich ist zusätzlich ein transienter  $K^+$ -Ausstrom ( $I_{to}$ ). Darauf folgt eine Plateauphase (Phase 2), bei der das Membranpotenzial bei etwa 0 mV liegt. Diese Plateauphase beruht auf einem Gleichgewicht der zuvor genannten repolarisierenden Ströme und dem langsamen  $Ca^{2+}$ -Einstrom ( $I_{Ca}$ ), der nach der Aktivierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle vom L-Typ ( $Ca_v1.2$ , *L-type calcium channel*, LTCC) ab etwa -40 mV einsetzt. Die LTCC haben eine lange Öffnungszeit und bestimmen maßgeblich die Dauer der Plateauphase. Die endgültige Repolarisation (Phase 3) beginnt mit der Inaktivierung der LTCC, was dazu führt, dass die repolarisierenden Ströme die Überhand gewinnen. Hierzu zählen verschiedene

Kaliumströme, unter denen die  $K^+$ -Auswärtsgleichrichter (verzögerte Gleichrichter,  $I_K$ -Strom), welche erst mit der Depolarisation ihre Leitfähigkeit steigern, als wichtigste zu nennen sind. Die terminale Repolarisation (ab ca. -70 mV) wird wieder vom  $I_{K1}$ -Strom getragen, der damit die Rückkehr zum Ruhemembranpotenzial (Phase 4) herbeiführt (Pape et al., 2014; Schmidt et al., 2007).

Kardiomyozyten weisen eine ausgeprägte Refraktärphase auf. In der Zeit von der Depolarisation über die gesamte Plateauphase hinweg ist die Herzmuskelzelle absolut refraktär, d.h. in dieser Zeit ist es nicht möglich, ein erneutes AP auszulösen. Eine Superposition von Einzelzuckungen oder gar die Tetanisierung sind im Gegensatz zur Skelettmuskulatur im Herzen nicht möglich. Erst nach einer Rückkehr des Membranpotenzials auf Werte kleiner -40 mV und der damit einhergehenden Rückkehr der  $Na^+$ -Kanäle in den aktivierbaren Zustand ist ein erneutes AP auslösbar. Man spricht hier von der relativen Refraktärphase, da ein in ihr ausgelöstes AP eine kleinere Amplitude mit geringerer Anstiegssteilheit und kürzerer Gesamtdauer aufweist.

### 1.2.2.2 Der cytoplasmatische Kalziumtransient

Für den erfolgreichen Wechsel von Kontraktion und Relaxation muss die intrazelluläre Ca-Konzentration,  $[Ca^{2+}]_i$ , im Kardiomyozyten in einem definierten Zeitrahmen ansteigen und wieder abfallen, was als Kalziumtransient (CaT) bezeichnet wird. Der CaT stellt dabei das entscheidende Element bei der Verknüpfung von elektrischer Erregung und mechanischer Kontraktion in der elektromechanischen Kopplung dar. Eine kontinuierliche Abfolge von CaT ist eine Voraussetzung für einen physiologischen Herzschlag. Dabei bewegt sich die cytosolische Ca-Konzentration im Ventrikelmyozyten zwischen ~100 nM während der Diastole und ~1000 nM während der Systole (Kockskämper, 2016). Die wichtigsten Kanäle, die zu einem Ca-Anstieg führen, sind der Kalziumkanal vom L-Typ und der Ryanodinrezeptor, während der Ca-Abfall hauptsächlich durch den sarkolemmalen  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher und durch die Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums vermittelt wird (vgl. Abb. 1-3).

### 1.2.2.3 Kalziumanstieg im Cytoplasma

Der kardiale Kalziumkanal vom L-Typ (mit der kardialen Isoform der porenbildenden  $\alpha_1$ -Untereinheit:  $\alpha_1C$ , Genprodukt des *CACNA1C*-Gens,  $Ca_v1.2$ , *L-type calcium channel*, LTCC) ist Zielstruktur der Arzneistoffklasse der Ca-Kanalblocker vom Dihydropyridin-Typ (z.B. Nifedipin, Amlodipin), weswegen er in der Literatur auch als Dihydropyridinrezeptor (DPHR) bezeichnet wird. Als spannungsabhängiger Kanal nimmt seine Offenwahrscheinlichkeit bei steigendem Membranpotenzial (weniger negativ als -40 mV) zu, so dass durch ihn bei der Depolarisation eine vergleichsweise hohe Ca-Leitfähigkeit des Sarkolemmes entsteht. Er ist verantwortlich für den quantitativ bedeutsamsten Anteil des Ca-Einstroms ( $I_{Ca,L}$ ) von extrazellulär während des Aktionspotenzials in Ventrikelfibrozyten. Damit liefert er zum einen das Trigger-Ca für die Ryanodin-Rezeptoren und spielt zum anderen eine wichtige Rolle bei der Beladung des SR-Ca-Speichers. Der Ca-Einstrom wird dabei durch zwei Mechanismen limitiert: Einen spannungsabhängigen und einen Ca-abhängigen Mechanismus. Letzterer setzt bei ansteigender  $[Ca^{2+}]_i$  nach Ca-Einstrom durch die LTCC und CICR aus dem SR im Sinne eines negativen Feedbacks ein und wird dabei von Ca im Komplex mit Calmodulin vermittelt, welches zur Inaktivierung des Kanals an dessen C-Terminus bindet (Peterson et al., 1999). LTCC sind in der sarkolemmalen Membran an der Zelloberfläche wie auch in den T-Tubuli lokalisiert, wo sie spezieabhängig unterschiedlich große Cluster bilden. In ventrikulären Rattenmyozyten beinhalten beispielsweise 85% der Cluster durchschnittlich ~10 Kanäle (Scriven & Moore, 2013; Scriven et al., 2010).

In der SR-Membran befindet sich der Ryanodin-Rezeptor (kardiale Isoform: 2, RyR2, RyR), ein Kalziumkanal, dessen Name auf das Ryanodin zurückgeht, ein Diterpenderivat aus *Ryania speciosa*, welches einen phytogenen Liganden an diesem Kanal darstellt und *in vivo* als Krampfgift wirkt (Hänsel & Sticher, 2010). Der RyR stellt somit einen ligandengesteuerten Kalziumkanal dar, dessen Offenwahrscheinlichkeit von der cytosolischen Konzentration des Liganden abhängt. Neben Ryanodin binden weitere pharmakologische (z.B. Koffein) und physiologische Liganden an den Kanal. Zu den physiologischen Liganden zählen  $Ca^{2+}$ -Ionen und Adenosintriphosphat (ATP), wobei letzteres als Kofaktor gemeinsam mit Ca an den Kanal bindet (Ríos, 2018). Eine



Erhöhung der Ca-Konzentration - wie sie im Falle eines Einstroms über den LTCC erfolgt - führt dabei zur Öffnung des RyR und zieht eine Ca-Freisetzung aus dem SR nach sich. Die Regulation der Aktivität des RyR ist komplex und erfolgt von cytosolischer und luminaler Seite aus. Neben der Phosphorylierung an unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen erfolgt eine Regulation in Abhängigkeit der intraluminalen Ca-Konzentration. Je höher diese ist, desto affiner erfolgt die Bindung des cytosolischen Ca. Dies führt im Umkehrfall zu einem Adaptationsmechanismus, bei dem nach der Aktivierung des Kanals die Offenwahrscheinlichkeit mit abnehmender SR-Ca-Konzentration (im Rahmen der CICR) sinkt und als ein negatives Feedback gesehen werden kann. Weitere Inaktivierungsmechanismen des RyR werden diskutiert, wie z.B. der einer zeitabhängigen, völligen Inaktivierung mit anschließender Erholung ähnlich der in Na<sup>+</sup>-Kanälen beobachteten (Bers, 2002). Die RyR sind ebenfalls in Clustern organisiert, die in Ratten-Ventrikelzellen durchschnittlich ~14 Kanäle (Baddeley et al., 2009; Kohl et al., 2013; Scriven et al., 2013) und einen Durchmesser von bis zu 200 nm aufweisen (Bers, 2002). Betrachtet man die Verteilung der oben genannten Cluster aus Ca-Regulationsproteinen im Bereich einer Diade, so findet sich eine Kopplung von jeweils einem LTCC-Cluster im Sarkolemm mit einem RyR-Cluster in der Membran der Terminalzisterne des SR. Diese liegen sich mit geringem Abstand (Kopplungsspalt, *junctional cleft*) von ~12-15 nm (Scriven et al., 2013) gegenüber und stellen einen lokalen, funktionellen Ca-Freisetzungs-Komplex, genannt *Couplon*, dar (Bers, 2001).

Bei einer Depolarisation der Zellmembran bedarf es theoretisch nur eines LTCC pro *Couplon* und damit verbunden einem Einstrom von ~2-4 Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Bers, 2002), die an einen RyR binden, um den vollen Freisetzungsprozess an diesem *Couplon* zu aktivieren. Dies liegt daran, dass die Ca-Freisetzung aus dem SR durch Öffnen des RyR ausreicht, um die benachbarten RyR ebenfalls zu öffnen und im Sinne einer Kettenreaktion auf diese Weise das gesamte *Couplon* zu aktivieren. Tatsächlich steigt die Ca-Konzentration im Kopplungsspalt durch den I<sub>Ca,L</sub>-Strom initial auf 10-20 μM an, was zur Öffnung der RyR und dabei zu einem weiteren Anstieg der lokalen Ca-Konzentration auf 200-400 μM führt (Bers, 2001). Das Ca diffundiert von hier aus weiter ins Cytosol, um an die Myofilamente (MF) zu binden. Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivierung eines *Couplons* durch ein benachbartes *Couplon* nicht

möglich, da diese mit einer longitudinalen Distanz von  $\sim 2\ \mu\text{m}$  zu weit voneinander entfernt sind; das freigesetzte Ca würde über diese Diffusionsstrecke zu stark verdünnt werden, um im benachbarten *Couplon* noch RyR aktivieren zu können. Daher ist für eine synchrone Auslösung der Kontraktion eine simultane Aktivierung aller ca. 20.000 *Couplons* (Bers, 2008) innerhalb der Zelle nötig. Dies wird möglich durch das Aktionspotenzial, bei dem sich die Depolarisation durch den schnellen  $\text{Na}^+$ -Einstrom mit einer hohen Ausbreitungsgeschwindigkeit über das Sarkolemm bewegt und über die T-Tubuli bis tief in das Zellinnere gebracht wird. Dies führt zu einer (nahezu) gleichzeitigen Öffnung der spannungsgesteuerten LTCC, durch welche daraufhin das Trigger-Ca simultan in die *Couplons* einströmt und die Ca-Freisetzung in ihnen aktiviert.

### 1.2.2.4 Disinhibition der Myofilamente: Aktivierung des Querbrückenzyklus

Die Sarkomere als kleinste kontraktile Einheit der Zelle bestehen neben den eigentlichen Myofilamenten Aktin (dünnes Filament) und Myosin (dickes Filament) aus einer Reihe von Begleitproteinen, welche ihre Stabilität und physikochemischen Eigenschaften gewährleisten und z.T. eine regulatorische Funktion haben. Der Troponin-Tropomyosin-Komplex stellt einen solchen Proteinkomplex mit regulatorischer Funktion dar. Er besteht aus dem Troponin, einem globulären Protein aus drei Untereinheiten: Troponin I (TnI) mit einer starken Affinität zu Aktin, Troponin C (TnC) mit einer Bindungsstelle für Ca und Troponin T (TnT), welches an das Tropomyosin bindet. Bei letzterem handelt es sich um ein fadenförmiges Strukturprotein innerhalb des Tropomyosin-Komplexes, welches dem Aktin eng anliegt, dabei die Kontaktstelle für das Myosinköpfchen blockiert und somit die Interaktion der Myofilamente bei niedriger intrazellulärer Ca-Konzentration (während der Diastole) inhibiert.

Der Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf das systolische Niveau aktiviert die Kontraktion. Für eine halbmaximale Kontraktion bedarf es einer  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von  $\sim 600\ \text{nM}$  (Bers, 2002). Dabei bindet Ca an das TnC, welches daraufhin eine Konformationsänderung durchläuft, die

eine stärkere Bindung des TnI bewirkt. Dies resultiert letztendlich in einer Verlagerung des TnT, wonach die Myosinbindungsstelle am Aktin freigelegt ist und eine Disinhibition (der Interaktion) der Myofilamente zur Folge hat. Nun kann der Querbrückenzyklus ablaufen, bei dessen Beginn das im Komplex mit Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) an das Myosinköpfchen gebundene ATP in Adenosindiphosphat (ADP) und eine Phosphatgruppe ( $PO_4^{2-}$ ,  $P_i$ ) gespalten wird. Die aus der Spaltung frei werdende Energie wird für die Knüpfung der Bindung zwischen Myosinköpfchen und Aktinfilament verwendet. Nun werden das  $P_i$  und ADP nacheinander aus der Bindungstasche freigesetzt, was ein Abknicken des Myosinköpfchens um einen Winkel von insgesamt  $45^\circ$  zum Aktinfilament zur Folge hat. Diese Bewegung wird auch als Kraftschlag bezeichnet und führt zum Gleiten des Aktinfilaments entlang des Myosinfilaments in Richtung der M-Scheiben, wodurch sich die Filamente um  $\sim 1\%$  verkürzen. Damit sich das Myosinköpfchen wieder löst und in die Ausgangsposition gebracht wird, um einen weiteren Querbrückenzyklus zu durchlaufen, bedarf es einer erneuten Bindung von ATP. Weitere Zyklen werden ablaufen, solange die  $[Ca^{2+}]_i$  ausreichend hoch ist und genügend ATP im Cytosol vorhanden ist. Die Kontraktion der gesamten Zelle beruht demnach auf dem Durchlaufen mehrerer Querbrückenzyklen unter Beteiligung aller intakten Sarkomere.

### 1.2.2.5 Kalziumabfall im Cytoplasma und Relaxation des Kardiomyozyten

Damit es zur Relaxation des Kardiomyozyten kommt, muss der Querbrückenzyklus unterbrochen werden. Dies geschieht durch einen Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ , was eine Dissoziation des Ca vom TnC nach sich zieht. Dieser Ca-Abfall geschieht durch vier Mechanismen: Extrusion über den (1) sarkolemmalen  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher (NCX) und die (2) sarkolemmale  $Ca^{2+}$ -ATPase, sowie Aufnahme von Ca durch (3) mitochondriale Uniporter in die Mitochondrien und Wiederaufnahme durch die (4) SERCA ins SR. Dabei stellen der NCX und die SERCA die quantitativ bedeutsamsten Mechanismen mit einem Anteil von 98-99% am Kalziumabfall dar (Bers, 2002). Das Verhältnis der Anteile von NCX und SERCA ist dabei abhängig von der betrachteten Spezies und liegt beispielsweise in Ratten bei etwa 92% SERCA und 7% NCX,

wohingegen sich beim Menschen ein Verhältnis von ca. 70% SERCA und 28% NCX findet (Bers, 2001).

Die Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA) gehört zur Klasse der P-Typ-ATPasen und transportiert  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gegen ihren elektrochemischen Gradienten aus dem Cytosol ins SR-Lumen. Dabei nutzt sie die aus der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie. Die in Kardiomyozyten vorherrschende Isoform ist die SERCA2a, welche als Genprodukt des SERCA2-Gens (*ATP2A2*) eine von drei Splicevarianten darstellt (Kranias & Hajjar, 2012). Die SERCA-Aktivität wird über Phospholamban (Genprodukt des *PLN*-Gens, PLB) reguliert (Kranias & Hajjar, 2012), einem kleinen Protein, das in der SR-Membran lokalisiert ist. Im unphosphorylierten Zustand bindet PLB an die SERCA und verringert dabei ihre Aktivität, weswegen es auch als „Bremse“ der SERCA bezeichnet wird. Durch die Phosphorylierung von PLB dissoziiert dieses von der SERCA ab und lagert sich in der SR-Membran zu Oligomeren zusammen, wobei der inhibitorische Effekt auf die Kalziumpumpe verloren geht (James et al., 1989; Kranias & Hajjar, 2012). Der SERCA (zusammen mit PLB) kommt eine wichtige Rolle in der Regulation diastolischer und systolischer kardialer Funktionen zu. Dabei ist sie zum einen mit ihrem entscheidenden Beitrag zum Ca-Abfall an der diastolischen Relaxation beteiligt. Zum anderen wird über die SERCA-Aktivität die Beladung des SR gesteuert und damit auch die Menge an systolischer Ca-Freisetzung maßgeblich determiniert (Kockskämper, 2016).

Der sarkolemmale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (kardiale Isoform: NCX1, Genprodukt des *SLC8A1*-Gens,  *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger*, NCX) besteht aus einem einzelnen Polypeptid. Er tauscht 3  $\text{Na}^+$  gegen 1  $\text{Ca}^{2+}$  aus und erzeugt dabei einen Nettostrom ( $I_{\text{NCX}}$ ) über die Zellmembran. In Abhängigkeit von Membranpotenzial und transmembranären  $[\text{Na}^+]$ - und  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Gradienten kann der Austausch in beide Richtungen erfolgen. Man unterscheidet einen  $\text{Na}^+$ -Influx- $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux-Modus (Vorwärts-Modus) vom  $\text{Na}^+$ -Efflux- $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Modus (Rückwärts-Modus) (Bers, 2002). Unter physiologischen Bedingungen arbeitet der NCX vornehmlich im Vorwärts-Modus, und transportiert Ca aus der Zelle, während er dabei einen depolarisierenden Einwärtsstrom erzeugt. Lediglich zu Beginn des AP, wenn bei der Öffnung der  $\text{Na}_v$ -Kanäle die lokale,

subsarkolemmale  $[Na^+]$  ansteigt, wird der NCX für kurze Zeit im Rückwärts-Modus arbeiten, Ca ins Cytosol befördern und dabei einen repolarisierenden Auswärtsstrom erzeugen (Bers, 2002).

Um langfristig einem Netto-Gewinn bzw. -Verlust von Ca in der Zelle entgegenzuwirken, muss die Menge an Ca-Efflux über den NCX der Menge an Ca-Influx über den LTCC entsprechen. Das Gleiche gilt für das SR: die Menge an wiederaufgenommenem Ca über die SERCA muss der Menge an freigesetztem Ca über die RyR entsprechen. Auf diese Weise wird ein Steady-State-Zustand in der Zelle aufrecht erhalten.

### 1.2.3 Die Rolle des sarkoplasmatischen Retikulums

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR), wie das endoplasmatische Retikulum in Myozyten genannt wird, ist das wichtigste intrazelluläre Ca-Speicher- und -Freisetzungskompartiment. Mit einer intraluminalen, freien Ca-Konzentration  $[Ca^{2+}]_{SR}$  von 1-1,5 mM (Shannon et al., 2003) besteht ein ausgeprägter Konzentrationsgradient zwischen dem SR und dem Cytosol, während eine berechnete Gesamtkonzentration im SR,  $[Ca^{2+}]_{SR, total}$ , von ~19 mM (Shannon & Bers, 1997) eine starke intraluminale Ca-Pufferung anzeigt. Die Ca-Beladungsmenge des SR stellt einen wesentlichen Faktor für eine geregelte Funktion des Kardiomyozyten dar. Von ihr hängt die Größe des CaT und somit die Stärke der Kontraktion ab. Bei einer verminderten  $[Ca^{2+}]_{SR}$  (physiologisch eher selten) wird ein Trigger-Ca-Strom über die LTCC nur eine kleine CICR auslösen, die zu einer schwächeren Kontraktion führt; bei einer sehr niedrigen  $[Ca^{2+}]_{SR}$  kann die CICR sogar völlig ausbleiben (Bers, 2002). Bei einer erhöhten SR-Ca-Beladung (wie z.B. bei vermehrter Sympathikusaktivität oder unter Herzglykosid-Therapie) entsteht ein positiv inotroper Effekt, während sehr hohe  $[Ca^{2+}]_{SR}$  eine diastolische Ca-Freisetzung (Ca-Leck) über die RyR fördern und damit die Grundlage für pathologische Ca-Freisetzungen liefern. So können bei hohen intraluminalen und cytosolischen  $[Ca^{2+}]$  während der Diastole spontane Ca-Freisetzungen zur Aktivierung des Freisetzungsprozesses innerhalb eines *Couplons* führen, was als (*Ca*-)Spark bezeichnet wird. Bei einer ausreichend hohen cytosolischen  $[Ca^{2+}]$  kann ein Spark weitere (benachbarte) *Couplons* aktivieren, was in eine sich

wellenförmig ausbreitende Ca-Freisetzung mit (partieller) Aktivierung der Myofilamente und einer (insuffizienten) Kontraktion der Zelle übergehen kann. Ein arrhythmogener Mechanismus, der mit einer erhöhten diastolischen  $[Ca^{2+}]$  einhergehen kann, ist die vermehrte Extrusion von Ca über den elektrogenen NCX im Vorwärtsmodus, welcher dabei einen Einwärtstrom generiert und eine verzögerte Nachdepolarisation auslösen kann. Das daraus folgende extra(systolische) AP kann zu lebensbedrohlichen Arrhythmien führen (Berlin et al., 1989; Schlotthauer & Bers, 2000; Sedej et al., 2010).

Bei den zuvor genannten Zusammenhängen kommt dem RyR eine besondere Rolle zu, da die Regulation seiner Offenwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der  $[Ca^{2+}]_{SR}$  geschieht und er daher die Verknüpfung zwischen Ca-Beladungsmenge und -Freisetzungsmenge (bei der CICR) des SR liefert. Die in der SR-Membran lokalisierten RyR stellen zugleich Ca-Freisetzungskanäle und Gerüstproteine dar. In einem makromolekularen Komplex vereinen sie eine Reihe von Regulator- und Adapterproteinen, die sowohl von der cytosolischen Seite als auch von der luminalen Seite der SR-Membran mit den RyR assoziiert sind. Das auf der luminalen Seite gelegene Protein Calsequestrin (kardiale Isoform Calsequestrin-2) bindet (pro Molekül)  $\sim 35-40$   $Ca^{2+}$ -Ionen mit niedriger Affinität ( $K_m \approx 500 \mu M$ ) (Bers, 2001) und trägt damit entscheidend zur intraluminalen Ca-Pufferung bei. Durch die verhältnismäßig schwache Bindung entsteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem Ca-Calsequestrin-Komplex und dem  $[Ca^{2+}]_{SR}$ ; dies hält letztere und damit auch den transmembranären Gradienten niedrig und begünstigt (und ermöglicht) damit die SERCA-Funktion. Darüber hinaus stellt Calsequestrin zusammen mit Triadin und Junctin einen luminalen Ca-Sensor dar (Bers, 2001), der die Offenwahrscheinlichkeit des RyR in Abhängigkeit von der  $[Ca^{2+}]_{SR}$  reguliert. Auf der cytosolischen Seite des RyR-Komplexes befinden sich weitere funktionell relevante Proteine wie z.B. das Immunophilin Calstabin-2 (FK506-bindendes Protein 12.6, FKBP), welches den RyR in geschlossenem Zustand stabilisiert (Fill & Copello, 2002; Marx et al., 2000) oder Calmodulin (CaM) und Sorcin, die als wichtige Faktoren zur Inaktivierung des RyR beitragen (Farrell et al., 2003). Einen wichtigen Regulationsmechanismus des RyR stellt darüber hinaus die Variation seines Phosphorylierungszustands dar. Daher sind

verschiedene (Phospho-)Transferasen, wie die CaM-abhängige Kinase II (CaMKII) und die Proteinkinase A (PKA), sowie (Phospho-)Hydrolasen, wie die Proteinphosphatase 1 und 2A (PP1 und PP2A), an der cytosolischen Seite des Komplexes lokalisiert (Wehrens & Marks, 2004).

Neben dem RyR existiert noch ein weiterer ligandengesteuerter Kalziumkanal in der SR-Membran, der durch den intrazellulären Signalstoff Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) aktiviert und als IP<sub>3</sub>-Rezeptor (IP<sub>3</sub>-R) bezeichnet wird (Kockskämper et al., 2008a). Durch die Stimulation des IP<sub>3</sub>-Signalwegs via G-Protein gekoppelten Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCR) vom Kopplungstyp Gα<sub>q</sub> (bsplw. durch Endothelin-Applikation) kann die zusätzliche Ca-Freisetzung durch die IP<sub>3</sub>-R den elektrisch stimulierten CaT vergrößern und die Kontraktion verstärken (Harzheim et al., 2009; Kockskämper et al. 2008b; Mackenzie et al., 2002). Damit besteht eine Funktion der IP<sub>3</sub>-R darin, bei Stimulation von Gα<sub>q</sub>-Rezeptoren (α<sub>1</sub>-adrenerge Rezeptoren, α<sub>1</sub>-R, sowie Endothelin-A-Rezeptoren, ET<sub>A</sub>-R, und Angiotensin-1-Rezeptoren, AT<sub>1</sub>-R) eine positiv inotrope Wirkung hervorzurufen. Physiologisch könnte die auf diese Weise vermittelte „Booster-Funktion“ von IP<sub>3</sub> relevant sein, um die Kontraktilität bei mechanischem Stress und/oder sympathischer Aktivierung (bei Aktivierung des jeweiligen Hormonsystems) zu unterstützen (Kockskämper, 2016).

### 1.2.4 Modulation der Herzleistung auf zellulärer Ebene

Die physiologischen Anforderungen an die Herzfunktion sind nicht konstant. Häufig unterliegen sie raschen Wechseln, was eine schnelle und effiziente Modulation der Herzleistung erforderlich macht. Dazu gehört zum Beispiel der variable Sauerstoffbedarf der Gewebe, der stark vom Aktivitäts- und Belastungsgrad des Organismus abhängig ist. Weiterhin spielt die mechanische und metabolische Belastung der kardialen Gewebe selbst eine Rolle und führt zum Schutz der Organfunktion ebenfalls zu Anpassungsreaktionen. Diese werden dann auf physikalischem Wege durch Dehnung oder auf biochemischem Wege über Transmittersysteme und/oder lokale Metabolite vermittelt. Prinzipiell können auf zellulärer Ebene dabei 3 Bereiche



unterschieden werden, an denen Modulationen vorgenommen werden. So kann die (1) elektrische Erregbarkeit der Zellen durch Veränderung der Membranleitfähigkeit angepasst werden. Die hierbei erfolgende Modulation von Ionenkanälen spielt physiologisch v.a. in Zellen des EBLs eine Rolle. Die Modulation des (2) Ca-Transienten und die Anpassung der (3) Sensitivität der Myofilamente werden als wichtigste Mechanismen in Ventrikelfmyozyten im Folgenden besprochen.

Das vegetative Nervensystem stellt mit seinem Transmittersystem ein schnelles und effizientes Werkzeug zur Modulation der Ca-Regulation in Ventrikelfmyozyten bereit. Während die vagale (parasympathische) Innervation des Ventrikelfmyokards nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil existiert und deswegen nur von untergeordneter Relevanz (und dafür wichtig in EBLs-Zellen) ist, spielt der sympathische Anteil des vegetativen Nervensystems hier eine tragende Rolle. Bei Aktivierung des Sympathikus wird aus den Varikositäten der autonomen sympathischen Nervenfasern im *Plexus cardiacus* der Neurotransmitter Noradrenalin (NA) freigesetzt. Gleichzeitig wird in den sympathischen Ganglienzellen des Nebennierenmarks das Hormon Adrenalin (A) ausgeschüttet, welches als endokriner Transmitter (zeitverzögert) zum Herzen gelangt. Die beiden Catecholamine binden daraufhin an die kardialen Adrenozeptoren, von denen dem  $\beta_1$ -Rezeptor ( $\beta_1$ -R) in diesem Zusammenhang die größte Bedeutung zukommt. Die Aktivierung des GPCR vom Kopplungstyp  $G_{\alpha_s}$  führt daraufhin zur Steigerung der Enzymaktivität der membranständigen Adenylatzyklase. Die ansteigende Konzentration des Signalstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (*cyclic AMP*, cAMP) führt nach Bindung an die PKA zur Dissoziation der Untereinheiten und aktiviert diese. Die PKA phosphoryliert eine Reihe von Proteinen, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind. Die wichtigsten sind dabei LTCC, RyR, TnI und PLB (Bers, 2002). Durch die Phosphorylierung des LTCC wird dessen Offenwahrscheinlichkeit erhöht und in Folge der  $I_{Ca,L}$ -Strom verstärkt (Bers, 2002). Dabei sind verschiedene Phosphorylierungsstellen bekannt, wie das S1928 der  $\alpha_1C$ -Untereinheit sowie S478 und S479 der  $\beta_2$ -Untereinheit (Bünemann et al., 1999; Ganesan et al., 2006; Lemke et al., 2008). Der RyR wird auf ähnliche Weise von der PKA moduliert. Seine Phosphorylierung am S2809 (Marx et al., 2000; Rodriguez et al., 2003) und S2030 (Xiao et al., 2005) führt zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit



und beschleunigten und vermehrten Ca-Freisetzung aus dem SR. Weiterhin wird PLB von der PKA am S16 (Mattiuzzi et al., 2005) phosphoryliert, was eine Oligomerisierung bei gleichzeitiger Dissoziation von der SERCA begünstigt und dabei die Inhibition der SR-Ca-Pumpe vermindert. Über die Phosphorylierung des TnI wird die Affinität des TnC für Ca gesenkt und damit die Sensibilität der Myofilamente verringert, was zu einer schnelleren Relaxation führt (Kentish et al., 2001). Zusammengefasst führen Effekte einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation zu einem (1) erhöhten Ca-Einstrom durch die LTCC und damit mehr Trigger-Ca für die CICR und extra Ca zur Beladung des SR, einer (2) erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der RyR einhergehend mit vermehrter Ca-Freisetzung aus dem SR, einer (3) Steigerung der SERCA-Aktivität mit Beschleunigung der Ca-Wiederaufnahme ins SR, sowie einer (4) Verminderung der Ca-Affinität der Myofilamente zur Begünstigung einer schnelleren Dissoziation. Damit tragen (1) und (2) direkt zur positiv inotropen Wirkung des Sympathikus bei, während (3) und (4) v.a. für den positiv lusitropen Effekt verantwortlich sind und indirekt - durch die Förderung der SR-Beladung - ebenfalls positiv inotrop wirken (Eisner et al., 2013).

Das Prinzip der Modulation von Ca-regulierenden Proteinen mittels Übertragung von Phosphatgruppen findet sich noch in weiteren Signalwegen und kann über unterschiedliche Kinasen vermittelt werden. Zu den wichtigsten bekannten zählen die CaM-abhängige Kinase II (Anderson et al., 1994; Mattiuzzi et al., 2005; Wehrens et al., 2004) und die Proteinkinase C (Benitah et al., 2010; Bers, 2008; Kranias & Hajjar, 2012). Darüber hinaus finden neuere Studien Hinweise darauf, dass neben der Phosphorylierung auch die Nitrosylierung als Mechanismus zur Modulation von Ca-regulierenden Proteinen eine Rolle zu spielen scheint (Bers, 2015; Irie et al., 2015).

Die Variation der Myofilamentsensitivität zeigt sich ebenfalls in weiteren Zusammenhängen. So unterliegt diese einer ständigen Anpassung durch den Frank-Starling-Mechanismus. Dabei führt die aus der diastolischen Füllung resultierende Dehnung der Myofilamente zu einer erhöhten Kontraktionskraft, welche einerseits auf eine Optimierung der Überlappung, was mit der Ausbildung von mehr Querbrücken einhergeht, und andererseits auf eine ausgeprägte Erhöhung der Ca-Sensitivität der Myofilamente zurückzuführen ist (Hibberd & Jewell, 1982; Kentish et al., 1986).

Weiterhin wird die Ca-Sensitivität der Myofilamente in Gegenwart von bestimmten Elektrolyten und lokalen Metaboliten variiert; so wird sie z.B. reduziert bei erhöhten Konzentrationen von  $H^+$ -,  $Mg^{2+}$ - und  $PO_4^{3-}$ -Ionen, wie sie im Falle einer Ischämie auftreten (Bers, 2002). Dies dient womöglich zum Schutz vor Schäden durch den hypoxischen Zustand.

Zuletzt seien noch die kardioaktiven Peptide genannt, die als endokrine Botenstoffe einen Effekt auf den CaT haben. Zu den in diesem Zusammenhang besser erforschten Peptiden zählen das von Endothelzellen und Kardiomyozyten sezernierte Endothelin (mit der kardiotropen Isoform Endothelin-1, ET-1) und das durch limitierte Proteolyse des aus der Leber freigesetzten Angiotensinogens stammende Angiotensin-II (AT-II). Beide vermitteln einen Effekt über kardiale Rezeptoren ( $ET_A$ -R und  $AT_1$ -R), die als GPCR vom Kopplungstyp  $G_{\alpha_q}$  in der Lage sind  $IP_3$  freizusetzen. Die daraus hervorgehende zusätzliche SR-Ca-Freisetzung kann im physiologischen Sinne die Kontraktilität unterstützen, während in einer pathologischen Situation (denkbar bei stark erhöhten Spiegeln kardioaktiver Peptide) proarrhythmogene Effekte auftreten können (Mackenzie et al., 2002; Proven et al., 2006; Zima & Blatter, 2004).

### **1.3 Nucleäre Kalziumregulation in Ventrikelmyozyten**

#### **1.3.1 Bedeutung von Kernkalzium: Die Erregungs-Transkriptions-Kopplung**

Die ständige Anpassung der kardialen Auswurfleistung an den Sauerstoffbedarf der Gewebe stellt eine besondere Leistung des Herzmuskels dar. Dabei spielen bei der akuten Anpassung neurohumorale Mediatoren (A, NA, ET-1, AT-II) eine wichtige Rolle und ermöglichen eine schnelle Modulation von Kontraktilität und Herzfrequenz (Kambayashi et al., 1992; Moravec et al., 1989; Salas et al., 2001). Eine langfristige Anpassung erfordert hingegen komplexe zelluläre Mechanismen, bei denen das Expressionsprofil moduliert wird. Während die Mechanismen der akuten Anpassung

bereits gut charakterisiert sind (vgl. Kap. 1.2.4), ist die langfristige kardiale Gen-Umprogrammierung und der Übergang in maladaptive Umbauvorgänge bis heute nicht vollständig verstanden. Allerdings konnten neuere Studien Ca-abhängige Transkriptionsfaktoren identifizieren und in einem Prozess, der Erregungs-Transkriptions-Kopplung (*excitation-transcription coupling*, ETC) genannt wird, einen Zusammenhang zwischen der zellulären Ca-Regulation und der Kontrolle der Gen-Transkription nachweisen (Dewenter et al., 2017). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass das Expressionsmuster von Ca-regulierenden Proteinen nicht statisch ist, sondern sich tatsächlich in einem dynamischen Zustand ständiger Umbauvorgänge befindet, der durch die Ca-vermittelte ETC im gesunden wie im kranken Herzen kontrolliert wird (Berridge et al., 2003). Für das adulte Herz konnte gezeigt werden, dass neurohumoraler und mechanischer Stress in einer Ca-vermittelten Reaktion die Reaktivierung eines fetalen Genprogramms induzieren kann, was zu einer maladaptiven Hypertrophie und einer veränderten Expression von Ionenkanälen und Transportern führt, die letztlich die Herzfunktion beeinträchtigt (Dewenter et al., 2017; Domínguez-Rodríguez et al., 2012). Vor diesem Hintergrund kommt dem nucleären Ca eine besondere Bedeutung zu, da in ihm das Signal zur Regulation der Genexpression codiert wird.

### 1.3.2 Ca-regulierende Proteine und die Kernhülle

Der Zellkern ist als subzelluläre Struktur von der Kernhülle (*nuclear envelope*, NE) umgeben, einem Membransystem, das aus einer inneren und äußeren Phospholipid-Doppelschicht mit einem Lumen dazwischen besteht. Während die innere Kernmembran (*inner nuclear membrane*, INM) an das Nucleoplasma grenzt, hat die dem Cytoplasma zugewandte äußere Kernmembran (*outer nuclear membrane*, ONM) Anschluss an das SR-Membransystem, welches den Nucleus mit konzentrisch angeordneten Zisternen umgibt. Es konnte gezeigt werden, dass auf Grund dieser Verbindung das SR und der NE ein kontinuierliches Lumen besitzen, was die Kernhülle ebenfalls zu einem Ca-Speicher-Kompartiment macht (Lee et al., 1998; Wu & Bers, 2006a). Der Bereich mit SR-Zisternen, welche die ONM direkt umgeben, wird auch als perinucleäre Region bezeichnet.

Obwohl die Kernhülle den Nucleus als autonomes Zellkompartiment abgrenzt, wird er von Poren durchdrungen. Diese liegen als zylindrischen Kanäle in der Mitte von supramolekularen Komplexen mit einer Größe von ~100 MDa, welche aus mehr als 100 verschiedenen Proteinen (Nucleoporinen) bestehen und Kernporenkomplexe (*nuclear pore complex*, NPC) genannt werden (Lee et al., 1998). Diese Kernporenkomplexe steuern den bidirektionalen Transport von Molekülen zwischen dem Cyto- und dem Nucleoplasma. Dabei müssen Moleküle, die größer sind als ~40 kDa, aktiv und signalabhängig transportiert werden (Davis, 1995). Hieran beteiligt sind Transportfaktoren, die nach ihrer jeweiligen Funktion Importine (IMP) bzw. Exportine (EXP) genannt werden. Diese transportieren Makromoleküle in Abhängigkeit ihrer (Transport-)Signalsequenz zusammen mit weiteren Nucleoporinen und unter Beteiligung des kleinen G-Proteins Ran (*Ras-related nuclear protein*) durch die NPC (Cortés et al., 2010). Dabei wird zwischen einem Kern-Aufenthalts-Signal (*nuclear localisation signal*, NLS) und einem Kern-Exklusions-Signal (*nuclear exclusion signal*, NES) unterschieden, welche in Form von bestimmten Aminosäuresequenzen kodiert sind. Die Kernporen erlauben dahingegen eine passive Diffusion von Molekülen mit einem Durchmesser von <5 nm, was sie frei durchlässig für Ionen (einschließlich Ca) und andere kleine Moleküle (niedermolekulare Metabolite, Nukleotide etc.) macht, die entlang ihres Konzentrationsgradienten in den Kern hinein oder hinaus diffundieren können (Bootman et al., 2009; Capelson et al., 2010; Keminer & Peters, 1999). Somit kann während jeder Ca-induzierten Ca-Freisetzung das im Cytoplasma ansteigende Ca in den Zellkern diffundieren und erzeugt dort einen leicht verzögerten CaT.

Die Membran der Kernhülle weist Einstülpungen auf, die bis tief in das Kerninnere reichen, z.T. Verzweigungen aufweisen und auch Kern-Tubuli oder nucleoplasmatisches Retikulum genannt werden (Alonso & García-Sancho, 2011; Bootman et al., 2009; Echevarría et al., 2003; Ljubojevic et al., 2014). Das Lumen der Einstülpungen ist kontinuierlich mit dem Cytoplasma und ermöglicht cytosolischen Botenstoffen einen erleichterten Zugang zum zentralen Nucleoplasma (Escobar et al., 2011).

Im perinucleären SR (PN-SR) sowie in der Kernhülle selbst sind eine Reihe von Proteinen lokalisiert, die direkt oder indirekt an der Ca-Regulation beteiligt sind. Dazu

gehören Ca-Freisetzungskanäle wie der RyR und der IP<sub>3</sub>-R, Proteine zur Wiederaufnahme des Ca in den NE bzw. das SR, wie die SERCA zusammen mit PLB (im PN-SR und im NE v.a. in der ONM) und der NCX (nur in der INM), sowie die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. (Escobar et al., 2011; Galva et al., 2012; Gerasimenko & Gerasimenko, 2004; Harzheim et al., 2009; Ledeen & Wu, 2007; Ljubojevic et al., 2014; Marius et al., 2006; Wu et al., 2016). Darüber hinaus findet sich in der Kernhülle die gesamte Ausstattung für den Phosphoinositid-Signaltransduktionsweg, angefangen bei den Gα<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren für (Nor-)/Adrenalin, ET-1 und AT-II (α<sub>1</sub>-R, ET<sub>A</sub>-R und AT<sub>1</sub>-R), über die Phospholipase C (PLC) und ihr Substrat Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) bis hin zu den bereits genannten IP<sub>3</sub>-R (Tadevosyan et al., 2012; Wu et al., 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der (prohypertrophe) Agonist ET-1 über eine IP<sub>3</sub>-vermittelte Ca-Freisetzung aus der Kernhülle und des perinucleären SR zu einer selektiven Erhöhung des nucleären Ca führt (Kockskämper et al., 2008a; Wu et al., 2006b). Dies deutet darauf hin, dass der Nucleus ein eigenes Ca-Regulationssystem haben könnte, welches womöglich zusätzlich zur cytoplasmatischen Ca-Regulation einen Einfluss auf den nucleären CaT und über die ETC auf die Expressionsteuerung hat.

## 1.4 Klinische Bedeutung des Kernkalziums

### 1.4.1 Die Rolle des Kalziums bei der Regulation der Transkription und der Vermittlung prohypertropher Signalwege

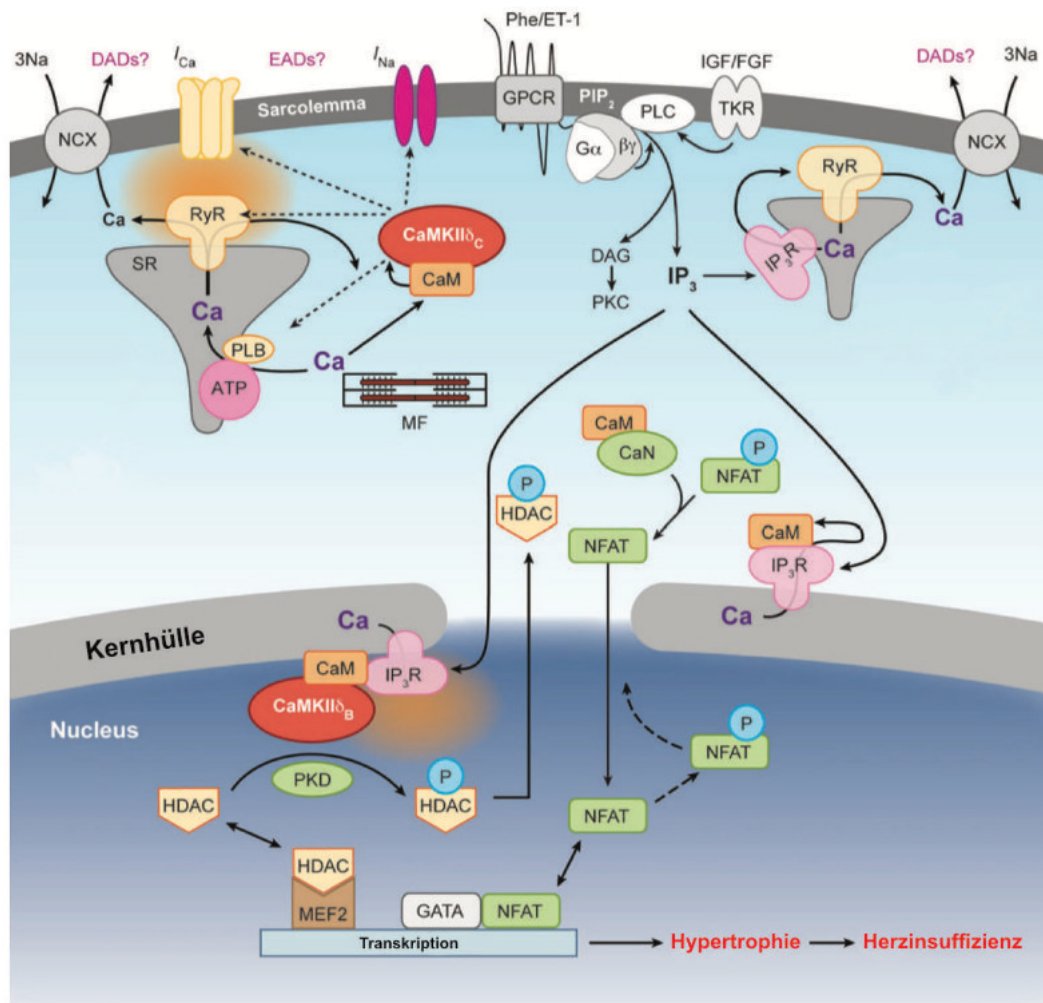
Bei der Ca-abhängigen Regulation der Genexpression und der Beteiligung an prohypertrophen Signalwegen konnte das Ca-Adapterprotein Calmodulin (CaM) als Vermittler identifiziert werden. CaM kommt als intrazellulärer Signalstoff in nahezu allen Zellen vor. Durch die Bindung von Ca erfährt es eine Konformationsänderung, die eine weitere Interaktion mit Zielproteinen ermöglicht (Maier & Bers, 2002). Die kardiale Überexpression von CaM führt in transgenen Mäusen zu Hypertrophie, während eine CaM-Hemmung die Induktion von Hypertrophie unterdrücken kann

(Bers, 2008; Gruver et al., 1993). Dies legt nahe, dass die Ausbildung des Ca-CaM-Komplexes (Ca-CaM) eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung hypertropher Umbauvorgänge spielt. Die beiden prohypertrophen Transkriptionsfaktoren GATA4, ein Zinkfingerprotein, welches nach der Basensequenz, an die es bindet, benannt ist, und MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) werden durch zwei bekannte Ca-CaM-abhängige Signalwege aktiviert: der (1) Ca-Calmodulin-abhängige Proteinkinase-II (CaMKII)-HDAC-MEF2-Signalweg und der Ca-Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase-Calcineurin-NFAT-GATA4/6-Signalweg (Backs et al., 2009; Molkentin, 2000; Passier et al., 2000; Wilkins et al., 2004; Zhang & Brown, 2004).

Der CaMKII-HDAC-MEF2-Signalweg (Abb. 1-4) beginnt mit erhöhten Ca-Konzentrationen im Cytoplasma und/oder im Nucleus und endet mit einer Änderung der Expression prohypertropher Gene im Zellkern. Dabei führt die initiale Ca-abhängige Ausbildung des Ca-CaM-Komplexes zur Aktivierung der Ca-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase-II (CaMKII, kardiale Isoform: CaMKII $\delta$ , Genprodukt des *CAMK2D*-Gens). Alle CaMKII-Isoformen bestehen aus einer N-terminalen katalytischen und einer regulatorischen Domäne (mit Autophosphorylierungsstellen wie T286) sowie einer C-terminalen Assoziations-Domäne. Nachdem die Kinase einmal durch den Ca-CaM-Komplex aktiviert wurde, kann sie durch die Autophosphorylierung an T286 ihren Aktivierungszustand noch über die Dissoziation hinaus aufrecht erhalten (Maier & Bers, 2002). Es wurden mehrere Splicevarianten der CaMKII $\delta$  beschrieben, von denen die  $\delta_B$ - und  $\delta_C$ -Variante sich im Proteinbestand von adulten Myokardzellen nachweisen ließen (Zhang & Brown, 2004). Sie unterscheiden sich durch unterschiedliche Transportsignalsequenzen. So trägt die CaMKII $\delta_B$  ein NLS und ist somit präferenziell im Nucleus lokalisiert, während die CaMKII $\delta_C$  mit einem NES versehen ist und somit vorwiegend im Cytoplasma präsent ist. Die CaMKII $\delta$  gehört zu den Serin/Threonin-Kinasen und moduliert im Cytoplasma die Aktivität verschiedener (Ca-regulierender) Proteine (z.B. LTCC, RyR, PLB), wohingegen sie im Zellkern an der Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 (*activating protein-1*), ATF-1 (*activating transcription factor-1*), SRF (*serum response factor*), CREB (*cAMP-response element binding protein*) und MEF2 beteiligt ist (Bers, 2008). Dabei ließ sich ein Zusammenhang zwischen der CaMKII $\delta$ -abhängigen Aktivierung von MEF2 und der

Entwicklung kardialer Hypertrophie zeigen (Passier et al., 2000). Diese Aktivierung erfolgte jedoch nicht durch Phosphorylierung von MEF2, sondern wird über Histondeacetylasen (HDAC) der Klasse II vermittelt. Die HDAC gehören zusammen mit ihren Antagonisten, den Histonacetyltransferasen (HAT), zu einem ubiquitären epigenetischen Steuerungssmechanismus. Histone, um welche sich die Desoxyribinukleinsäure (DNA) zu kompakten Nucleosomen aufwickelt und zu Chromatin kondensiert, binden die DNA über die ionische Anziehung zwischen negativ geladenen Phosphatgruppen im DNA-Rückgrat und positiv geladenen Histonproteinen. Die Acetylierung von Lysinresten an Histonproteinen durch HAT führt zum Verlust der Basizität der Aminogruppen und verringert damit die Dichte an positiven Ladungen. Dies hat eine leichtere Dissoziation der entsprechenden DNA-Abschnitte von den Histonen zur Folge und ist Voraussetzung für die Transkription der entsprechenden Abschnitte. Die HDAC hingegen entfernt Acetylgruppen, verstärkt dabei die Bindung zwischen DNA und Histonproteinen und fungiert auf diese Weise als transkriptioneller Repressor. Dabei führt die Assoziation von HAT bzw. HDAC mit Faktoren, welche an spezifische DNA-Regionen binden, zu einer Aktivierung bzw. Repression von Zielgenen (Backs & Olson, 2006; Heineke & Molkentin, 2006). Die im Kardiomyozten exprimierten HDAC der Klasse II (HDAC4, 5, 7 und 9) besitzen eine spezifische Bindungsdomäne für MEF2 und zusätzlich zwei in diesem Zusammenhang relevante N-terminale Serinreste. Durch die Bindung der HDAC an MEF2 wird die Expression der entsprechenden Gene reprimiert. Werden jedoch die beiden genannten Serinreste von der CaMKII phosphoryliert, bindet die HDAC an das Chaperon 14-3-3, welches eine Konformationsänderung der HDAC auslöst und dabei eine NLS maskiert, was zum Export des Enzyms aus dem Zellkern führt. Als Folge wird die Repression der MEF2-kontrollierten prohypertrophen Gene aufgehoben (Bers, 2008).





**Abbildung 1-4 Kalzium-abhängige Aktivierung prohypertropher Signalwege im Kardiomyozyten**

Zusätzlich zur cytoplasmatischen Ca-Regulation bei der elektromechanischen Kopplung (oben links) und der potenziellen Rolle von IP<sub>3</sub>-R bei der Entstehung von Arrhythmien (oben rechts) ist die Ca-abhängige Aktivierung prohypertropher Signalwege dargestellt. Die Details und Abkürzungen werden im Text erläutert. Die orangefarbenen Wolken stellen Bereiche dar, in denen lokale [Ca<sup>2+</sup>]-Erhöhungen eine kritische Rolle einnehmen. Phosphorylierte Strukturen sind mit „P“ gekennzeichnet.

(modifiziert nach Bers, 2008)

Im Ca-CaM-Calcineurin-NFAT-GATA4/6-Signalweg (Abb. 1-4) führt die Ca-abhängige Ausbildung des Ca-CaM-Komplexes zur Aktivierung der Proteinphosphatase 2B, die



auch Calcineurin (CaN) genannt wird. Die Serin/Threonin-Phosphatase CaN besteht als Heterodimer aus einer katalytischen CnA- und einer regulatorischen CnB-Untereinheit. Die CnA-Untereinheit beinhaltet die CaM-Bindungsstelle und die Domäne mit der Phosphatase-Funktion, benötigt jedoch die CnB-Untereinheit, um aktiv zu werden (Heineke & Ritter, 2012). Die Ca-CaM-Affinität von Calcineurin ist deutlich höher als die der CaMKII ( $K_m \approx 0,1$  vs. 50 nM) (Bers, 2008). Dies legt nahe, dass die CaMKII bei kurzzeitig hohen Ca-Konzentrationen (während der Systole) aktiviert wird und ihre Aktivität über die Autophosphorylierung beibehält, während CaN mit einer deutlich langsameren Dissoziationskinetik eher bei länger anhaltenden kleineren  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen aktiviert wird (Dolmetsch et al., 1997; Molkentin, 2004).

Nach der Ca-CaM-abhängigen Aktivierung dephosphoryliert Calcineurin den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), welcher im inaktiven Zustand im Cytoplasma lokalisiert ist. Die Dephosphorylierung löst eine Konformationsänderung aus, bei der sich die Präsentation der Transportsignalsequenz ändert, was zu einem Import in den Zellkern führt. Dort wird NFAT aktiv und bindet an den kardialen Transkriptionsfaktor GATA (Isoform 4 und 6). Der Komplex aus NFAT und dem Zinkfinger-Protein GATA4/6 aktiviert daraufhin die Transkription prohypertropher Gene (Molkentin, 2004).

Beim Verständnis der Zusammenhänge in der Ca-abhängigen Kontrolle der kardialen Hypertrophie besteht die Schwierigkeit, dass Kardiomyozyten ständig periodisch schwankenden Ca-Signalen ausgesetzt sind, die bei jeder Kontraktion durch das Cytoplasma und den Zellkern strömen. Dabei produzieren möglicherweise die räumlich-zeitlichen Eigenschaften, die Dauer und die Amplitude individueller CaT unterschwellige Änderungen, die über die Zeit integriert in der Lage sind, ein bestimmtes Genprogramm mit prohypertrophen Genen zu stimulieren (Berridge et al., 2003). Man kann also sagen, dass - je nach betrachtetem Zeitrahmen - Ca in der Lage ist, die Kontraktion über die elektromechanische Kopplung in einem kurz getakteten Rhythmus zu steuern, während es über die Erregungs-Transkriptions-Kopplung auf einer längeren Zeitskala die Genexpression in Kardiomyozyten kontrolliert (Maier & Bers, 2002).

## 1.4.2 Kardiale Umbauvorgänge in der Pathogenese der Hypertrophie

Die hauptsächlich aus Studien an Tiermodellen gewonnenen Daten zur Pathogenese der kardialen Hypertrophie zeigen Änderungen der Ca-Regulation, die sich im Rahmen der Umbauprozesse entwickeln. Dabei tritt eine bereits früh einsetzende verstärkte Kontraktilität basierend auf größeren CaT während der kompensatorischen Phase der Hypertrophie auf (Brooksby et al., 1993; Chen-Izu et al., 2007; Plackic et al., 2016; Tomaselli & Marbán, 1999). Hierfür gibt es mehrere Erklärungsansätze. Zum einen werden elektrisch-induzierte Umbauvorgänge im linken Ventrikel dafür verantwortlich gemacht, die eine AP-Verlängerung bewirken (Brooksby et al., 1993; Chen-Izu et al., 2007; Tomaselli & Marbán, 1999). Verlängerte Depolarisationsphasen im AP führen zu vermehrtem Ca-Einstrom ( $I_{Ca,L}$ ) über LTCC, verminderte Ca-Extrusion über NCX und erhöhter Ca-Wiederaufnahme in das SR via SERCA (Wang, Nolan, Kutschke, & Hill, 2001; Zwadlo & Borlak, 2005). Darüber hinaus stellen längere Repolarisationsphasen einen Risikofaktor für frühe Nachdepolarisationen (*early afterdepolarisations*, EAD) dar (Wickenden et al., 1998). Diese sind als erneute Membrandepolarisation vor Abschluss der Repolarisationsphase definiert und können zur Entstehung lebensbedrohlicher Torsade-de-Pointes-Arrhythmien führen. Zum anderen lässt sich eine Verstärkung der elektromechanischen Kopplung als Erklärung heranziehen, bei der eine Modulation der RyR-Aktivität für die verstärkte Kontraktilität und den vergrößerten CaT verantwortlich gemacht wird. Dabei ist die Ca-Freisetzung aus dem SR über die RyR bei gleichem Trigger-Ca-Strom deutlich größer (Chen-Izu et al., 2007; Shorofsky et al., 1999). Dies wird mit einer erhöhten Expression von  $IP_3$ -R im Bereich der Kopplungsspalte in Zusammenhang gebracht, die mit ihrer (zusätzlichen) Ca-Freisetzung die RyR sensibilisieren und dabei gleichzeitig das diastolische SR-Ca-Leck verstärken (Harzheim et al., 2009). Das dabei erhöhte diastolisch-freigesetzte Ca wird über den NCX im Efflux-Modus aus der Zelle transportiert, wobei ein Natriumeinstrom entsteht und zu späten Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarisations*, DAD) und in Folge dessen zu spontanen Arrhythmien führen kann (vgl. Abb. 1-4). Vor dem Hintergrund einer erhöhten Ausschüttung von  $IP_3$ -freisetzenden Botenstoffen (ET-1, AT-II, NA/A), wie sie im Rahmen der neurohumoralen Kompensation eines kardialen Leistungsdefizits

auftritt, kommt der vermehrten  $IP_3$ -R Expression eine besondere Bedeutung zu; hierin liegt eine mögliche Erklärung für das vermehrte Auftreten von linksventrikulären Arrhythmien im hypertrophen Herzen. Eine erhöhte Inzidenz bei gleichzeitig vergrößerter mittlerer Amplitude der spontanen SR-Ca-Freisetzen im Myozyten führt neben dem vermehrten Auftreten von arrhythmogenen Ereignissen auch zu dysfunktionaler Kontraktilität und durch die cytosolische Ca-Überladung zur Auslösung der mitochondrial-vermittelten Apoptose (Harzheim et al., 2009; Kapur et al., 2010; Shorofsky et al., 1999). Die dabei untergegangenen Myozyten werden durch Fibroblasten ersetzt, wodurch eine Gefügedilatation des Myokards mit einer weiteren Verminderung der Kontraktilität und Störungen der Erregungsausbreitung einhergeht.

Während Änderungen der cytoplasmatischen Ca-Regulation eine entscheidende Rolle bei den Umbauvorgängen der Hypertrophie spielen, wurden in diesem Zusammenhang Änderungen in der nucleären Ca-Regulation weit weniger untersucht. Neuere Studien haben gezeigt, dass während der Entwicklung der Hypertrophie spezifische Veränderungen an der Kernstruktur auftreten. Dazu gehört die Vergrößerung des Zellkerns und der Verlust der Einstülpungen der Kernhülle (Ljubojevic et al., 2014; Plackic et al., 2016). Auch die Expression der an der nucleären Ca-Homöostase beteiligten Rezeptoren und Kanäle wurde verändert; so zeigte sich z.B. eine erhöhte perinucleäre Expression von  $IP_3$ -R, RyR und SERCA (Ljubojevic et al., 2014; Plackic et al., 2016). Daher kann vermutet werden, dass auch das nucleäre Ca einen maßgeblichen Einfluss auf die Induktion und das Voranschreiten der Umbauvorgänge bei der kardialen Hypertrophie hat.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Trotz ihrer großen Bedeutung für die Erregungs-Transkriptions-Kopplung sind die zellulären Mechanismen, die das nucleoplasmatische Ca regulieren, nur wenig verstanden. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, nucleäre Ca-Regulationsmechanismen zu identifizieren und zu charakterisieren. Dabei werden im ersten Teil die Rolle des cytoplasmatischen Kalziums, der perinucleären Kalziumspeicher und der SERCA-Funktion für die Regulation des nucleoplasmatischen Ca in Kardiomyozyten untersucht, wobei ein physiologisches Tiermodell zur Anwendung kommt. Im zweiten Teil wird anhand eines pathologischen Tiermodells die Übertragbarkeit der aus dem ersten Teil gewonnenen Ergebnisse überprüft und ein Vergleich der Tiermodelle hinsichtlich der Ca-regulierenden Mechanismen unter besonderer Berücksichtigung eines möglichen Einflusses der spezifischen Pathologie angestellt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Zur Gewinnung von frisch isolierten, adulten Herzmuskelzellen wurden männliche Ratten im Alter von 12-18 Wochen verwendet. Sämtliche experimentelle Arbeiten sowie das Handling der Tiere standen im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates und waren von der zuständigen Behörde genehmigt (Regierungspräsidium Gießen, Projekt V 54 - 19 c 20 15 (1) MR 20/29 NR. A 21/2010 und AK-9-2014-Kockskämper).

#### **2.1.1 Physiologisches Tiermodell**

Für die Versuche am physiologischen Modell wurden Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) genutzt. Der Stamm leitet sich von den Wistar-Ratten ab und wird weitläufig als gesundes Kontrolltier zu den spontan-hypertensiven Ratten (SHR) verwendet. Spontan-hypertensive Ratten wurden durch Inzuchtkreuzung aus Wistar-Ratten mit genetischer Hypertonie erstmals in den 1960er Jahren in Kyoto, Japan gezüchtet (Okamoto & Aoki, 1963). Die normotensiven Ratten aus dieser Zuchtreihe wurden als Kontrollen mit gleichem genetischen Hintergrund weiter verpaart und sind unter dem Namen Wistar-Kyoto-Ratten kommerziell erhältlich.

Die Wistar-Kyoto-Ratte ist als Versuchstier in unserer Forschungseinrichtung seit 2010 etabliert und gilt als ein Standardmodell für Studien an physiologisch intakten (gesunden) Kardiomyozyten.

#### **2.1.2 Pathologisches Tiermodell**

Spontan-hypertensive Ratten (SHR) stellen ein gut charakterisiertes Krankheitsmodell für die essentielle Hypertonie und hypertensive Herzerkrankung dar (Doggrell &

Brown, 1998; Kokubo et al., 2005). Der vom japanischen Arzt und Wissenschaftler Kozo Okamoto durch selektive Kreuzung von hypertensiven Wistar-Ratten gezüchtete Stamm (Okamoto & Aoki, 1963) entwickelt mit einem Alter von 8-12 Wochen spontan einen primären Hypertonus, in dessen Folge mit 3-5 Monaten eine kompensatorische Hypertrophie entsteht, die schließlich mit 15-24 Monaten in eine Herzinsuffizienz übergeht (Plackic, 2017). Diese pathologische Abfolge ähnelt in vielerlei Hinsicht den Prozessen, welche auch bei hypertensiven Menschen zu beobachten sind (Brooksby et al., 1993; Tomanek & Hovanec, 1981), wodurch das Tiermodell sich zur Erforschung von hypertonie-induzierten Remodelingvorgängen bei der kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz eignet.

In früheren Studien konnten Zusammenhänge zwischen Hypertonie und einem Remodeling der elektromechanischen Kopplung sowie der cytoplasmatischen Ca-Regulation in SHR gezeigt werden (Brooksby et al., 1993; Chen-Izu et al., 2007; Fowler et al., 2005; Harzheim et al., 2009; Shorofsky et al., 1999). Auch wenn die Frage nach einem Remodeling auf der Ebene des nucleären Ca in SHR bisher noch nicht abschließend geklärt ist, so stellt dies einen wichtigen und plausiblen (möglichen) Zusammenhang für die Entstehung der kardialen Hypertrophie dar. Indizien hierfür liefern Änderungen des nucleären CaT, die bereits in jungen SHR-Tieren gezeigt werden konnten (Plackic, 2017; Plackic et al., 2016).

Die SHR-Ratte ist in unserer Forschungseinrichtung ein langjährig genutztes Versuchstier und als gut bekanntes Tiermodell Gegenstand zahlreicher Studien.

## 2.2 Chemische Substanzen

Die verwendeten chemischen Substanzen wurden im Allgemeinen von Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Bis zur jeweiligen Verwendung erfolgte eine sachgerechte Lagerung, die sich nach den substanzspezifischen Erfordernissen richtete (bei Raumtemperatur im Sicherheitsschrank, im Kühl- oder Gefrierschrank, ggf. bei -80 °C). Für die Herstellung von Lösungen und Puffern wurde Ultra-Reinstwasser Typ 1 (Aqua valde purificata) verwendet, welches mit Hilfe eines Milli-Q Reference A+ Wasseraufbereitungssystems (Merck Millipore, Darmstadt) hergestellt wurde.

## 2.2.1 Pharmakologisch aktive Substanzen

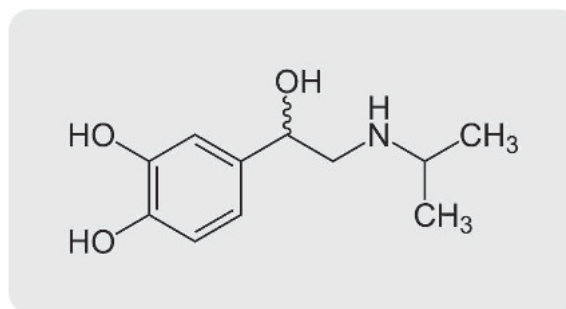
### 2.2.1.1 Isoprenalin

Isoprenalin ist ein synthetisches Catecholaminderivat und stellt pharmakologisch einen selektiven Agonisten an  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren dar. Isoprenalin wurde 1938 im Zusammenhang mit der Forschung an Catecholaminrezeptoren erstmals synthetisiert und im Rahmen von tierexperimentellen Studien auf eine potentiell therapeutische Anwendung überprüft. 1940 führte der Pharmahersteller Boehringer Ingelheim Isoprenalin als Arzneimittel zur Anwendung am Menschen ein. Auf Grund seiner bronchospasmolytischen Eigenschaft wurde es zunächst als Aerosol zur inhalativen Anwendung (Aludrin®) in der Therapie von asthmatischen Beschwerden eingesetzt. Später kamen als weitere Anwendungen die intravenöse Verabreichung als Sympathomimetikum bei kardiogenem Schock sowie die topische Behandlung von Pruritus und allergischen Exanthenen hinzu. Obwohl Isoprenalin über 20 Jahre als eines der gebräuchlichsten und wirksamsten Bronchospasmolytika eingesetzt wurde, wird es heute nicht mehr zu diesem Zweck verwendet. Dies liegt an seiner unspezifischen  $\beta$ -agonistischen Wirkung, welche nicht selten mit kardialen Nebenwirkungen wie Tachyarrhythmien einhergeht, und der kurzen Halbwertszeit, wodurch es von den modernen  $\beta_2$ -Sympathomimetika vom Markt verdrängt wurde. In Deutschland ist 2018 kein zugelassenes isoprenalin-haltiges Arzneimittel mehr gelistet, während es weltweit in der Anwendung als Akutmittel in der Notfallmedizin (zur i.v. Applikation) nach wie vor zu finden ist (Bruchhausen et al., 1993).

Bei der chemischen Grundstruktur des Isoprenalins (Abb. 2-1) handelt es sich um ein Phenylethylamin-Gerüst, welches durch die beiden Hydroxylgruppen am Aromaten und dem daraus resultierenden Brenzcatechin-Strukturelement an Noradrenalin erinnert. Durch die Einführung des Isopropyl-Substituenten am N-Atom wird die relative Selektivität für  $\beta$ -Rezeptoren erzeugt. Isoprenalin diente darüber hinaus in der Pharmaforschung mit seiner Struktur als Grundlage für die Entwicklung der  $\beta$ -Blocker (Steinhilber et al., 2010).

**Abbildung 2-1 Strukturformel von Isoprenalin**

Isoprenalin weist eine catecholaminähnliche Struktur auf und bindet als kompetitiver Agonist an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren. Die relative Selektivität für die  $\beta$ -Adrenozeptoren resultiert aus dem Isopropyl-Substituenten am sekundären Aminostickstoff. Die gewellte Bindung weist auf das Chiralitätszentrum hin. Das (R)-Isoprenalin stellt hierbei das Eutomer dar.



In der vorliegenden Arbeit diente das Isoprenalin zur  $\beta$ -adrenergen Stimulation der Kardiomyozyten. Zum Einsatz kam das Isoprenalin-HCl ( $C_{11}H_{17}NO_3 \cdot HCl$ ;  $M_r = 247,72$ ; CAS-Nr.: 51-30-9; Best.-Nr.: I5627-5G, Sigma), welches auf Grund der Oxidationsempfindlichkeit unter Zusatz von Ascorbinsäure (Sigma) im Stoffmengenverhältnis 1 : 5 (Isoprenalin : Ascorbinsäure) in Mess-Tyrode (Tab. 2-8) gelöst wurde. Die so entstandene Lösung wurde vor Versuchsbeginn frisch hergestellt und war zum Verbrauch am jeweils gleichen Tag bestimmt. Eine kurzfristige Lagerung zwischen den Experimenten eines Versuchstags erfolgte luftundurchlässig und lichtgeschützt bei 5°C. Die Applikation erfolgte über das Superfusionssystem.

**2.2.1.2 Koffein**

Koffein ist ein phytoogenes Purinalkaloid welches in einer Reihe von Nutzpflanzen vorkommt. Beispiele für Vertreter mit einem Koffeingehalt in relevanter Höhe sind Kaffee (*Coffea sp.* L., 0,7-2,5%), Tee (*Camellia sinensis* L., 1-4,5%), Mate (*Ilex paraguariensis* L., 0,5-1,5%) oder Guarana (*Paullinia cupana* L., 4-8%). Koffein gilt als natürliches Psychostimulanz, wird in Genussmittelzubereitungen aus den beschriebenen Pflanzen konsumiert und findet eine weltweite Verbreitung. 1820 wurde Koffein erstmals vom Apotheker Friedlieb Ferdinand Runge beschrieben, der die Substanz aus Kaffeebohnen (*Semen coffeae* von *Coffea arabica* L.) isolierte. Die endgültige Bestätigung der chemischen Struktur erfolgte 1895 mit der Totalsynthese durch Emil Fischer. Eine arzneiliche Anwendung fand das Koffein neben seiner Nutzung als Analeptikum, welche auch heute noch offizinell ist und in Form von Koffeintabletten



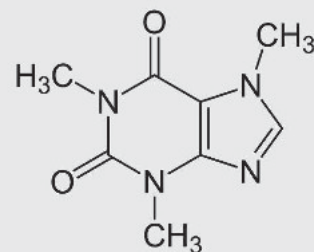
existiert, in der Vergangenheit vor allem als Antiasthmatikum. Die pharmakologischen Eigenschaften als Antagonist an Adenosinrezeptoren einerseits und als unselektiver Hemmstoff der Phosphodiesterase andererseits erklären diese Anwendungsgebiete (Ammon, 2010; Bruchhausen et al., 1993).

Koffein wurde im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen Studie zur Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher, d.h. SR und perinucleäre Speicher, der Kardiomyozyten verwendet. Dies wird möglich auf Grund der pharmakologischen Eigenschaft des Koffeins, in hoher Konzentration angewandt, die Ryanodinrezeptoren - durch eine Erhöhung der Kalziumaffinität - in ihrer Offenwahrscheinlichkeit zu modulieren und somit eine spontane Kalziumfreisetzung entlang des Konzentrationsgradienten ins Cytoplasma hervorzurufen (Kong et al., 2008).

Chemisch handelt es sich beim Koffein um ein 1,3,7-Trimethylxanthin (Abb. 2-2), welches eine strukturelle Ähnlichkeit mit Adenosin und cAMP aufweist, wodurch sich die pharmakologische Aktivität an den oben genannten Zielstrukturen erklären lässt (Steinhilber et al., 2010). Die wasserfreie Koffein-Base (*Coffeinum anhydricum*;  $C_8H_{10}N_4O_2$ ;  $M_r = 194,19$ ; CAS-Nr.: 58-08-2; Best.-Nr.: 27600-100G, Sigma) wurde in Mess-Tyrode gelöst. In den Versuchen wurde eine 20 mM Lösung als Bolus in die Superfusionskammer appliziert, wobei das applizierte Volumen dem jeweiligen Kammervolumen angepasst wurde, um die Zellen einer Endkonzentration von 10 mM auszusetzen.

### Abbildung 2-2 Strukturformel von Koffein

Das in der Natur vorkommende, vollmethylierte Xanthin besitzt eine adeninähnliche Struktur und bindet als kompetitiver Antagonist an A-Rezeptoren. Weitere Effekte werden über eine unselektive Hemmung der Phosphodiesterase vermittelt.



### 2.2.1.3 Thapsigargin

Thapsigargin ist ein Naturstoff aus der Klasse der Sesquiterpenlactone. Es stellt den Hauptinhaltsstoff von *Thapsia garganica* L. dar, eine im Mittelmeerraum beheimatete, gelbblühende Apiaceae (Abb. 2-3). Mit dem höchsten Gehalt an Thapsigargin in den Wurzeln (0,2-1,2%) und Früchten (0,7-1,5%) besitzt der Saft der giftigen Pflanze stark lokal reizende, blasenwerfende Eigenschaften. Erste Erwähnungen in der Literatur fand die Pflanze bei Hippokrates und Theophrastus 300-400 v. Chr., wo ihre Kontaktgigeneigenschaften beschrieben wurden. In der traditionellen arabischen und europäischen Medizin fand *T. garganica* bereits seit mehreren tausend Jahren Anwendung, wo sie unter anderem als Rheumamittel in Cantharidenpflastern genutzt wurde (Andersen et al., 2015; Hänsel & Sticher, 2010).

**Abbildung 2-3** *Thapsia garganica*

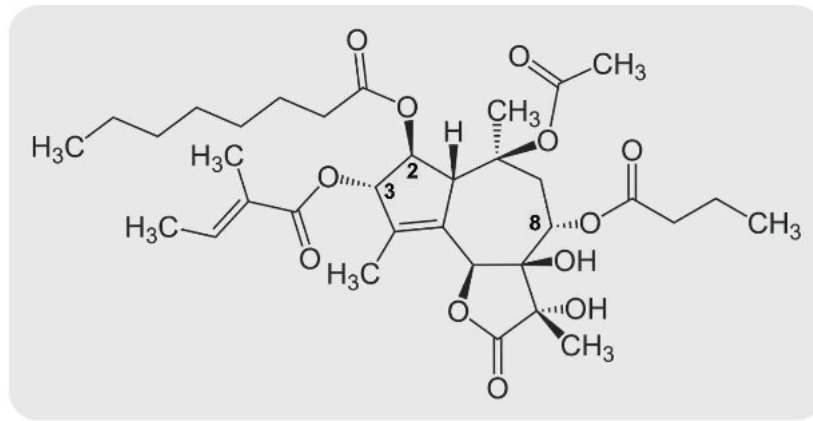
**Links:** Gelbe Infloreszenz von *Thapsia garganica*.

**Rechts:** Reife Infruteszenz der Spezies.

(aus Andersen et al., 2015)



Die chemische Struktur (Abb. 2-4) des Sesquiterpenlactons Thapsigargin gehört zur Untergruppe der Guajanolide. Auch wenn die zum biogenetischen Aufbau der Grundstruktur notwendigen Schritte aus dem gut erforschten Terpenoidstoffwechsel stammen, so ist die vollständige Biosynthese bis heute unklar. Entscheidend für die Wirkung sind die veresterten Seitenketten. Die röntgenkristallographische Analyse des Thapsigargin-SERCA-Komplexes konnte die Struktur-Wirkungsbeziehung aufklären: Für die Affinität von Thapsigargin zur SERCA-Pumpe ist vor allem die Bindung der C2-octanoyl-, C3-angeloyl- und C8-butanoyl-Seitenketten an die alpha-helikalen Strukturen der SERCA verantwortlich (Andersen et al., 2015).



**Abbildung 2-4 Strukturformel von Thapsigargin**

Der terpenoide Naturstoff Thapsigargin wirkt als irreversibler Inhibitor der SERCA. Seine pharmakologische bzw. toxikologische Aktivität geht auf die lipophilen Seitenketten an C2, C3 und C8 (durch Zahlen markiert) zurück. Diese sorgen für eine hohe Membran- und Gewebegängigkeit und ermöglichen die Interaktion mit den alpha-helikalen Strukturen der SERCA.

Die pharmakologischen Eigenschaften von Thapsigargin sind vielfältig. Die wohl am besten erforschte und zugleich wichtigste pharmakologische Aktivität stellt die Interaktion mit der SERCA-Pumpe dar. Thapsigargin bindet selektiv und irreversibel an die SERCA und wirkt als nicht-kompetitiver Inhibitor. Die Folge ist eine Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher und damit verbunden ein Anstieg des cytoplasmatischen Kalziums. Diese Eigenschaft macht Thapsigargin zu einem wertvollen pharmakologischen Hilfsmittel in Studien zur Erforschung der zellulären Kalziumregulation. Darüber hinaus sind noch weitere Wirkmechanismen von untergeordneter Bedeutung bekannt, wie die Stimulation der Bildung von Produkten der Lipooxygenase (z.B. Leukotrien B<sub>4</sub>) und Cyclooxygenase (z.B. Prostaglandin E<sub>2</sub>) (Hänsel & Sticher, 2010), was eine Erklärung für die schnell einsetzende, lokale proinflammatorische Wirkung liefert. Reichert sich die lipophile und gut membrangängige Substanz in Geweben an, führt dies nach längerer Exposition der Zellen zur Kalzium-induzierten Apoptose, was zu in vivo Studien mit Thapsigargin als potenziellem Zytostatikum führte. Hierfür wurde Mipsagargin entwickelt, eine modifizierte Prodrug-Struktur, in der die Seitenketten mit sog. Linker-Peptiden maskiert wurden, um einerseits die Lipophilie und Gewebegängigkeit zu verringern und andererseits die Bindung an die SERCA zu blockieren. Ziel war die Anwendung als zielgerichteter Arzneistoff (*targeted drug*) in der Therapie des Prostatakarzinoms. Im

neovaskularisierten Gewebe des Tumors wird die membranständige Serinprotease PSMA (Prostata-spezifisches Membranantigen) überexprimiert, welche die speziell dafür konstruierten Linker-Peptide von Mipsagargin spaltet, und damit zu einer gewebespezifischen Freisetzung des zytotoxischen Thapsigargin führt (Andersen et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Substanz Thapsigargin ( $C_{34}H_{50}O_{12}$ ;  $M_r = 650,76$ ; CAS-Nr.: 67526-95-8; Best.-Nr.: AG-CN2-0003, Biomol, Hamburg) zur Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher verwendet. Nach Lösung des Feststoffs in DMSO und Verdünnung in Mess-Tyrode auf eine Endkonzentration von  $5 \mu M$  erfolgte die Applikation über das Superfusionssystem.

## 2.3 Isolierung von ventrikulären Rattenmyozyten

Die Technik zur Isolierung von qualitativ hochwertigen Kardiomyozyten stellt einen entscheidenden Teil der Methoden dar und ist die Grundlage für den Erfolg der in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsreihen. In unserer Forschungseinrichtung gilt die Isolierung von Kardiomyozyten als etablierte und regelmäßig durchgeführte Standardtechnik (Plackic & Kocks-kämper, 2018). Im Folgenden werden die wichtigsten Arbeitsschritte und technischen Voraussetzungen beschrieben.

### 2.3.1 Puffer und Lösungen

#### 2.3.1.1 Basispuffer

Als Grundlage für die Herstellung der unterschiedlichen Lösungen zur Zellisolierung diente der Basispuffer (Tab. 2-1), welcher eine modifizierte Tyrode-Lösung darstellt. Die Lösung wurde durch Zugabe von NaOH auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt und mittels  $NaH_2PO_4$  und HEPES [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Best.-Nr.: HN78.4, Roth] gepuffert. Der Basispuffer wurde im Voraus hergestellt und bis zur Verwendung innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen im Kühlschrank (bei  $5^\circ C$ ) gelagert.

**Tabelle 2-1 Basispuffer (1 Liter, pH 7,4)**

Substanz	Konzentration (bei Lösungen)	Menge	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	(s)	7,597 g	Roth	130 mM
KCl	1 M	5,4 ml	Roth	5,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 M	0,5 ml	Sigma	0,5 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,33 M	1 ml	Roth	0,33 mM
HEPES	(s)	5,958 g	Roth	25 mM
Glucose x H <sub>2</sub> O	(s)	4,356 g	Roth	22 mM
Insulin (Insuman® Basal 100 I.E./ml)	100 I.E./ml	100 µl	Sanofi-Aventis, Frankfurt a. M.	0,01 I.E./ml
NaOH	1 M	q.s. zur Einstellung des pH-Wertes	Roth	

### 2.3.1.2 Kardioplegielösung

Die Kardioplegielösung (Tab. 2-2) wurde nach der Extraktion des Herzens verwendet, um das Myokard bei der weiteren Präparation ruhig zu stellen und die Kontraktion vollständig zu unterbinden. Die Kardioplegielösung zeichnet sich durch eine Kaliumkonzentration von >25 mM aus und liegt damit weit über der Kaliumkonzentration der Extrazellulärflüssigkeit (3,5-5 mM). Die aus der Änderung des Kaliumgleichgewichtspotenzials resultierende Anhebung des Ruhemembran-potentials der Kardiomyozyten führt zu einer permanenten Depolarisation der Zellmembranen und in Folge dessen zur Unerregbarkeit des Myokards. Die künstlich erzeugte Lähmung des Herzmuskels (Kardioplegie) dient dazu, eventuelle Schäden durch den temporären, ischämischen Zustand möglichst gering zu halten und das Gewebe auf diese Weise zu schützen. Die Kardioplegielösung wurde vor der Anwendung mittels Einleitung von reinem Sauerstoff oxygeniert.



Tabelle 2-2 Kardioplegie-Lösung

Basis-puffer	Substanz	Konzentration (bei Lösungen)	Menge	Hersteller	Endkonzentration
100 ml	CaCl <sub>2</sub>	1 M	15 µl	Sigma	0,15 mM
	Heparin-Na	5 kU/ml	40 µl	Roth	2 U/ml
	KCl	1 M	2 ml	Roth	25,4 mM

### 2.3.1.3 Kanülierungslösung

Im Rahmen der Präparation wurde die Kanülierungslösung (Tab. 2-3) zur Durchspülung der Gefäße als Vorbereitung auf die retrograde Perfusion verwendet. Mit dem Zusatz von Heparin (Best.-Nr.: 7692.1, Roth) soll einer potenziellen Thrombenbildung des in den Gefäßen verbliebenen Restblutes entgegengewirkt werden. Das in der Kanülierungslösung enthaltene Kalzium ermöglicht dem Myokard nach vorangegangener Kardioplegie wieder eine leichte Kontraktion, wodurch die Blutentleerung der Gefäße weiter gefördert wird. Die Kanülierungslösung wurde vor der Anwendung oxygeniert.

Tabelle 2-3 Kanülierungslösung

Basis-puffer	Substanz	Konzentration (bei Lösungen)	Menge	Hersteller	Endkonzentration
150 ml	CaCl <sub>2</sub>	1 M	22,5 µl	Sigma	0,15 mM
	Heparin-Na	5 kU/ml	60 µl	Roth	2 U/ml

### 2.3.1.4 Kalziumfreie Lösung

Diese Lösung ist nominell kalziumfrei, d.h. bei der Herstellung erfolgt kein Zusatz von Kalzium. Durch die Zugabe des Ca-affinen Chelatkomplexbildners EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N,N*-tetraessigsäure) wird etwaigen Kalziumkontaminationen Rechnung getragen, um auf diese Weise die tatsächliche Konzentration von

freien Kalziumionen möglichst gering zu halten. Mit der kalziumfreien Lösung (Tab. 2-4) wird bei der Perfusion des Herzens am Langendorff-System der Kalziumspiegel im Gewebe soweit abgesenkt, dass keine Kontraktionen mehr möglich sind. Weiterhin dient die Substanz BDM (2,3-Butandionmonoxim, Synonym: Diacetylmonoxim, Best.-Nr.: 3494.2, Roth) als Blocker der Kontraktion durch eine direkte Interaktion mit den kontraktilen Elementen. Dies ermöglicht eine Ruhigstellung des Herzmuskels, um den Energieverbrauch gering zu halten und schädlichen Folgen eines hypoxischen Zustands vorzubeugen, während das Gewebe für den enzymatischen Verdau im nächsten Schritt vorbereitet wird. Die kalziumfreie Lösung kam nach vorhergehender O<sub>2</sub>-Anreicherung zum Einsatz.

**Tabelle 2-4 Kalziumfreie Lösung**

Basis-puffer	Substanz	Konzentration (bei Lösungen)	Menge	Hersteller	Endkonzentration
50 ml	EGTA	100 mM	200 µl	Roth	0,4 mM
	BDM	(s)	50 mg	Roth	1 mg/ml
	Heparin-Na	5 kU/ml	20 µl	Roth	2 U/ml

### 2.3.1.5 Enzymlösung

Die Enzymlösung (Tab. 2-5) enthält eine Kombination von Enzymen mit geeigneter Spezifität und Aktivität, um die extrazelluläre Matrix zu destabilisieren und die Kardiomyozyten aus dem Gewebeverbund zu lösen. Die aus dem Bakterium *Clostridium histolyticum* isolierte Kollagenase ist eine Mischung verschiedener Isoformen von proteolytischen Enzymen, von denen zwei eine kollagenolytische Aktivität besitzen. Die Kollagenase Typ 2 (Best.-Nr: LS004177, Worthington, USA) zeichnet sich durch einen erhöhten Anteil von Enzymen mit Proteaseaktivität aus und wird vom Hersteller für die Anwendung an kardialem Gewebe empfohlen. Protease Typ XIV (Synonyme: Actinase E, Pronase; Best.-Nr.: P5147, Sigma) aus *Streptomyces griseus* stellt eine Mischung aus mindestens vier unterschiedlichen Proteasen dar.

Während Kollagenasen durch die Spaltung der Kollagen-Tripelhelices zur Destabilisierung des subepithelialen Bindegewebes, der Basalmembranen und des Epikards geeignet sind, wird mittels Proteasen eine weiterführende Spaltung der Kollagenfragmente, sowie die Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte und Proteine zur Verankerung in der extrazellulären Matrix erreicht. Die mit der Enzymlösung wieder auf 0,2 mM angehobene Kalziumkonzentration ist nötig, um die Aktivität der Enzyme zu gewährleisten. Durch den Zusatz von BDM wird weiterhin die Kontraktion blockiert. Während der gesamten Verdauzeit wurde die Enzymlösung durch Einleitung von reinem Sauerstoff oxygeniert.

**Tabelle 2-5 Enzymlösung**

Basis-puffer	Substanz	Konzentration (bei Lösungen)	Menge	Hersteller	Endkonzentration
50 ml	Kollagenase Typ 2 (255-330 U/mg)	(s)	40 mg	Worthington, USA	0,8 mg/ml
	Protease Typ XIV	(s)	2,5 mg	Sigma	0,05 mg/ml
	CaCl <sub>2</sub>	1 M	10 µl	Sigma	0,2 mM
	BDM	(s)	50 mg	Roth	1 mg/ml

### 2.3.1.6 Stopp-Lösung

Die Stopp-Lösung (Tab. 2-6) unterbricht den enzymatischen Verdau nach erfolgreicher Isolierung der Zellen. Auf diese Weise werden die Zellmembranen vor einer übermäßigen Proteolyse geschützt, so dass Funktion und Integrität erhalten bleiben. Das zugesetzte Albumin (Best.-Nr.: 8076.3, Roth) stellt ein Überangebot an (alternativem) Substrat dar, und führt mit seiner großen Oberfläche zu einer adhäsiven Bindung der in der Zellsuspension verbliebenen aktiven Enzyme. Die Stopp-Lösung bildet darüber hinaus die Grundlage für die Kalziumadaptation. Da dieser Prozess eine vulnerable Phase für die Kardiomyozten darstellt, ist währenddessen eine unnötige Zusatzbelastung durch Kontraktionen möglichst zu vermeiden, was durch den Zusatz von BDM erreicht wird.



**Tabelle 2-6 Stopp-Lösung**

Basis-puffer	Substanz	Konzentration (bei Lösungen)	Menge	Hersteller	Endkonzentration
15 ml	CaCl <sub>2</sub>	1 M	7,5 µl	Sigma	0,5 mM
	BDM	(s)	50 mg	Roth	1 mg/ml
	Albumin (Fraktion V)	(s)	30 mg	Roth	2 mg/ml

### 2.3.1.7 Kalziumlösungen

Die Kalziumlösungen (Tab. 2-7) dienen der schrittweisen Anhebung der Kalziumkonzentration bis zur finalen Arbeitskonzentration von 1,5 mM Ca, um den Zellen so eine schonende Adaptation zu ermöglichen. Würde stattdessen eine sofortige Zugabe der Endkonzentration ohne schrittweise Erhöhung erfolgen, führte dies zu erheblichen Verlusten bei der Zahl intakter Zellen.

**Tabelle 2-7 Kalziumlösungen**

Kalziumlösung 1					
Basis-puffer	Substanz	Konzentration (bei Lösungen)	Menge	Hersteller	Endkonzentration
15 ml	CaCl <sub>2</sub>	1 M	15 µl	Sigma	1 mM
	Albumin (Fraktion V)	(s)	30 mg	Roth	2 mg/ml
Kalziumlösung 2					
Basis-puffer	Substanz	Konzentration (bei Lösungen)	Menge	Hersteller	Endkonzentration
100 ml	CaCl <sub>2</sub>	1 M	150 µl	Sigma	1,5 mM

### 2.3.2 Grundlagen der retrograden Herzperfusion am Langendorff-System

Die Anfänge der Arbeit an isolierten, perfundierten Herzmodellen gehen bis ins 19. Jahrhundert zurück, wo Elias Cyon erstmals 1866 die Präparation eines isolierten Froschherzen gelang. Oscar Langendorff entwickelte die Methode weiter und führte 1895 die retrograde Perfusion von Säugetierherzen ein. Dabei wird eine Kanüle in die *Aorta ascendens* eines frisch explantierten Herzens eingebracht und eine O<sub>2</sub>-angereicherte Pufferlösung mit physiologischen Eigenschaften (physiologische Elektrolyt-Zusammensetzung, Isotonie, Euhydrie, 37°C) über ein Perfusionssystem durch die Kanüle kontinuierlich in die Aorta appliziert. Hierfür wird das Langendorff-System mittels einer Peristaltikpumpe betrieben und die Perfusionslösung durch ein Wasserbadmantel-Röhrensystem temperiert. Durch die, verglichen mit der physiologischen Flussrichtung des Blutes, retrograd strömende Perfusionslösung schließt die Aortenklappe auf Grund des Perfusionsdrucks und der Puffer strömt in Folge dessen in die beiden *Ostia* der Koronararterien. Die Lösung durchströmt dann die *Aa. coronariae dextra et sinistra* und folgt deren Verläufen und Aufzweigungen. So gelangt der Puffer über das Gefäßbett mit den Kapillaren auf eine elegante Weise fein verteilt tief in die kardialen Gewebe. Der venöse Rückstrom erfolgt über drei Herzvenen (*Vv. cardiacae parva et media et magna*), die in den *Sinus coronarius* drainieren, der im rechten Vorhof mit dem *Ostium sinus coronarii*, kurz vor dem septalen Segel der Trikuspidalklappe, in der posterioren Atriumswand endet. Von hier ab verlässt der Puffer das vaskuläre System und spült durch das Atrium, von wo aus die Lösung z.B. durch das *Ostium* der durchtrennten *V. cava inferior* das Herz verlässt (Bell et al., 2011).

Ein auf diese Weise an das Langendorff-System angeschlossenes Herz kann für eine Bandbreite an unterschiedlichen Studien genutzt werden und erlaubt dem Experimentator eine Untersuchung der Organfunktion unabhängig von konfundierenden Variablen durch andere Organsysteme. Die retrograde Herzperfusion nach Langendorff gilt daher als wertvolle Standardtechnik im kardiovaskulären Forschungsbereich.

Eine häufig genutzte Anwendung der Langendorff-Technik stellt der in dieser Arbeit verwendete enzymatische Verdau des Herzwes zur Gewinnung isolierter Myozyten dar. Hierbei wird das Organ wie oben beschrieben an das Langendorff-System angeschlossen und mit einer Enzymlösung perfundiert mit dem Ziel, den Gewebeverbund zu lösen. Dies stellt die Grundlage zur Gewinnung lebensfähiger Kardiomyozyten dar.

### 2.3.3 Myozytenisolationsverfahren

Die Ratten wurden mit Isofluran (Baxter) anästhesiert. Nachdem die Tiere gewogen wurden erfolgte die Dekapitation. Der Thorax wurde eröffnet und eine frisch hergestellte Heparin-Na-Lösung (1000 U/kg Körpergewicht) in den *Apex cordis* und die Leber injiziert, um der Bildung von Thromben entgegenzuwirken. Nachdem das Herz freipräpariert war, wurden die *Vv. cavae* und die Aorta durchtrennt und das Organ sofort in eiskühlte Kardioplegie-Lösung überführt. In dieser Lösung erfolgte die Kanülierung, bei der mit Hilfe eines Stereomikroskops eine Kanüle in die Aorta eingeführt und mit einer Ligatur fixiert wird, um im Anschluss die Gefäße mit Kanülierungslösung zu durchspülen und die Kanüle an das Langendorff-System (Abb. 2-5) anzuschließen. Die saubere und schnelle Durchführung der Kanülierung stellt einen entscheidenden Schritt für den Erfolg der gesamten Isolierung und die Zellqualität dar. Die Zeit von der Trennung des Herzens von der Blutzufuhr *in situ* bis zur erfolgreichen Kanülierung wurde als Qualitätskriterium gemessen und sollte im Idealfall unter 5 min liegen. Bei der gesamten Perfusion des Herzens, aber besonders beim Schritt der Kanülierung, ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen über die Kanüle in das Gefäßsystem gelangen, da die entstehenden Luftembolien irreversible Gefäßverschlüsse nach sich ziehen können und in der Regel zu hypoxischer Schädigung und Gewebeverlusten führen.



**Abbildung 2-5 Langendorff-System**

(1) Zirkulationswasserbad, (2) Peristaltikpumpe, (3) Reservoir der Perfusionslösung, (4) O<sub>2</sub>-Zufuhr, (5) Perfusat-Temperiersystem mit Wasserbad-Ummantelung, (6) Kanüle mit angeslossenem Rattenherz, (7) Temperierte Organbad-Kammer.

Als nächstes wurde über eine Dauer von 4 min mit kalziumfreier Lösung gespült. Bei allen über das Langendorff-System zugeführten Lösungen wurde in das Reservoir reines O<sub>2</sub>-Gas eingeleitet, um eine Anreicherung in den Lösungen zu bewirken. Nachdem das Gewebe frei von Blut gespült war und die Kontraktion des Myokards zum Erliegen kam, wurde die Enzymlösung eingewaschen. Die vom Organ abtropfende Perfusionslösung wurde nun im Organbad aufgefangen, so dass nach kurzer Füllungszeit das Herz vollständig in 37°C warmer Enzymlösung eingetaucht war und der Überlauf im Sinne eines Kreislaufs dem Lösungsreservoir erneut zugeführt wurde. Die Dauer des enzymatischen Verdaus betrug 30-50 min und ist u.a. abhängig von Gewebemasse, Enzymaktivität und Güte der initialen Gefäßspülung (Kanülierung). Das Abschätzen der richtigen Verdauezeit ist ein weiterer entscheidender Faktor für die anschließende Zellqualität; zu kurze Zeiten gehen mit insuffizienter Isolierung und in Folge dessen geringen Ausbeuten bei der Zellzahl einher, während eine zu lange Verdauezeit die Zellen schädigt und damit u.U. untauglich für die Versuche macht. Zum Zeitpunkt eines

ausreichenden enzymatischen Verdaus ist das Organ von blasser Farbe und weicher Konsistenz. Nimmt man einen Tropfen des Perfusats nach Passage des Gewebes von der Oberfläche des Organs ab und betrachtet diesen unter dem Lichtmikroskop, findet man zu diesem Zeitpunkt bereits einzelne Myozyten darin suspendiert.

Im nächsten Schritt wurde das Herz vom Perfusionssystem genommen, atriales von ventrikulärem Gewebe getrennt und in Stopp-Lösung (37°C) gegeben. Nach vorsichtiger Zerkleinerung wurden die ventrikulären Anteile durch ein Sieb mit 300  $\mu\text{m}$  Porenweite (Kobe, Marburg) filtriert. Die Kalziumkonzentration der so entstandenen Zellsuspension wurde daraufhin schrittweise erhöht, um einer Kalziumüberladung und damit einhergehende Zellschädigung vorzubeugen (Louch et al., 2011; Plackic & Kockskämper, 2018). Hierzu wurde nach 10-minütigem Ruhen der Zellsuspension und dabei erfolgter Präzipitation der Überstand entfernt und durch Kalziumlösung 1 ersetzt. Nach weiteren 10 min für die Adaptation an die höhere Kalziumkonzentration wurde erneut der Überstand entfernt und durch Kalziumlösung 2 ersetzt. Die isolierten Myozyten befanden sich von da an in der Standardarbeitskonzentration von 1,5 mM Ca und konnten bei Raumtemperatur mehrere Stunden gelagert werden.

### 2.3.4 Ausplattieren der isolierten Kardiomyozyten

Die Zellsuspension wurde vor dem Ausplattieren mit Kalziumlösung 2 auf die gewünschte Zelldichte verdünnt. Kulturschälchen mit Glasboden (Glass bottom dish, Durchmesser Schälchen/Glasboden: 35/22 mm, Glasdicke: 0,17 mm, Best.-Nr.: HBST-3522, WillCo Wells, Niederlande) wurden vor dem Ausplattieren mit Laminin (isoliert aus der murinen Sarkom-Zelllinie *Engelbreth-Holm-Swarm*; Best.-Nr.: L2020-1MG, Sigma) beschichtet. Hierzu wurde eine Lamininlösung (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Kalziumlösung 2) auf den Glasboden gegeben und für mindestens 1 Std. bei Raumtemperatur verschlossen gelagert. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert, so dass nur ein dünner Film auf der Glasoberfläche verblieb. Darauf wurden nun die Myozyten ausplattiert und für eine Dauer von ca. 20 min ruhen gelassen, um so eine möglichst gute Anhaftung zu erreichen.

## 2.4 Kalzium-Imaging am Konfokalmikroskop

### 2.4.1 Grundlagen der Kalziummessung mit Fluoreszenzindikatoren

Die Entwicklung der modernen Fluoreszenzindikatoren für Kalzium geht auf die 1980er Jahre zurück und wurde maßgeblich durch den US-amerikanischen Wissenschaftler Roger Y. Tsien (1952 - 2016) geprägt, der 2008 neben zwei weiteren Kollegen den Nobelpreis in Chemie für die Entdeckung und Weiterentwicklung des GFP (*green fluorescent protein*) erhielt. Bei Fluoreszenzindikatoren (= Fluoreszenzfarbstoffe) für Metallionen handelt es sich um Moleküle, die bei der Bindung eines entsprechenden Metallions ihre spektralen Eigenschaften ändern. Dies macht sie zu wertvollen Werkzeugen in zellbiologischen Studien und eröffnet ein breites Anwendungsspektrum innerhalb der Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und Fluoreszenzspektroskopie.

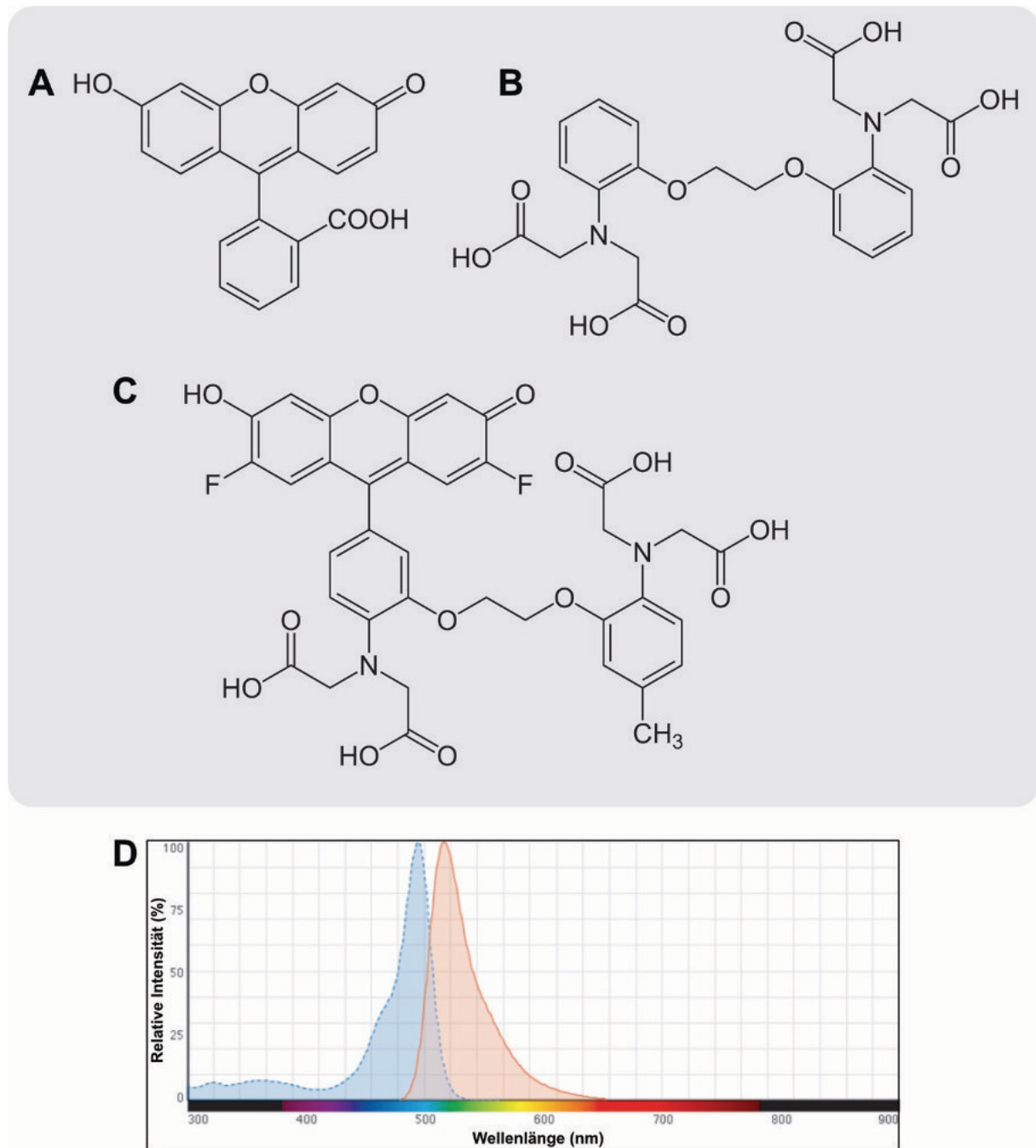
Bei der Herstellung von Ca-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen wird ein Ca-affiner Chelatkomplexbildner (z.B. EGTA, APTRA oder BAPTA) um ein als Chromophor fungierendes Strukturelement erweitert. Kommt diese Verbindung mit Kalziumionen in Kontakt entstehen Einschlusskomplexe. Die dabei ausgebildeten koordinativen Bindungen modifizieren das System konjugierter Doppelbindungen des Chromophors, was mit einer Änderung der Spektraleigenschaften einhergeht. Man unterscheidet hierbei: (1) Fluoreszenzindikatoren für die nicht-ratiometrische Messung (= nicht-ratiometrische Fluoreszenzindikatoren), die eine Ca-abhängige Erhöhung ihrer Fluoreszenzintensität aufweisen, d.h. praktisch erst im Komplex mit Kalziumionen fluoreszieren (z.B. Fluo-3, Fluo-4); (2) Fluoreszenzindikatoren für die ratiometrische Messung (= ratiometrische Fluoreszenzindikatoren), die Ca-abhängig die Wellenlänge ihres Absorptions- oder Emissionsmaximums ändern (z.B. Fura-2, Indo-1), so dass als Messparameter das Verhältnis (Ratio) der Intensitäten zweier Wellenlängen herangezogen werden kann.



Die kommerziell verfügbaren Fluoreszenzindikatoren zur Kalziummessung unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften wie Anregungs- ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) und Emissionswellenlänge ( $\lambda_{\text{em}}$ ), Dissoziationskonstante ( $K_d(\text{Ca})$ ) und ihrem Dynamikumfang, d.h. der Fluoreszenzintensitätsdifferenz zwischen Ca-gebundener und -ungebundener Form. Neben den physikochemischen Eigenschaften spielen weitere Faktoren bei der Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzindikators eine Rolle, wie die sich aus der jeweiligen experimentellen Fragestellung ergebenden Anforderungen und Limitationen, sowie die Kompatibilität mit dem verfügbaren instrumentellen Setup.

Die ratiometrischen Fluoreszenzindikatoren Fura-2 und Indo-1 sind auf Grund ihres hohen Dynamikumfangs gut für quantitative Messungen geeignet. Weitere Vorteile ergeben sich aus der ratiometrischen Messmethode, welche sich gegenüber nicht-ratiometrischer Messungen durch ein besseres Signal-Rauschverhältnis auszeichnet. Die Ratio ist als Messparameter außerdem weitgehend unabhängig von Konzentrationschwankungen des Fluoreszenzindikators innerhalb der Zellen und wird weniger von Photo-Bleicheffekten und Zellbewegungen (Kontraktionen) beeinträchtigt. Die häufig zur Anwendung kommenden Substanzen Fura-2 und Indo-1 erfordern Anregungslicht im UV-Bereich. Dies kann als Nachteil betrachtet werden, da bei andauernder UV-Bestrahlung von Zellen und Geweben schädliche Effekte zu erwarten sind. Die  $\lambda_{\text{ex}}$  im UV-Bereich macht die ratiometrischen Fluoreszenzindikatoren darüber hinaus ungeeignet für den Einsatz mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mit klassischer Laserausstattung (Argonlaser, Helium-Neonlaser), welches für die subzellulären Messungen in der vorliegenden Arbeit erforderlich war (Parys et al., 2014).

Als am besten geeignet für das vor Ort vorhandene Konfokalmikroskop und die etablierten Protokolle zur Kernkalziummessung erwies sich Fluo-4, ein nicht-ratiometrischer Fluoreszenzindikator. Alle Fluo-X-Indikatoren weisen ein BAPTA-Strukturelement [1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-*N,N,N,N*-tetraessigsäure] zur Ca-Komplexierung auf, welches kovalent mit einem Fluorescein-Derivat als Chromophor verknüpft ist (Abb. 2-6A-C).



**Abbildung 2-6 Chemische Struktur und Spektralkurve von Fluo-4**

Die chemische Struktur des nicht-ratiometrischen Fluoreszenzindikators Fluo-4 (C) setzt sich zusammen aus einem Ca-bindenden Strukturelement, das vom Chelatkomplexbildner BAPTA (B) stammt und einem als Chromophor fungierenden Element, welches eine leicht modifizierte Struktur des Fluoreszeins (A) darstellt. Die Spektralkurve (D) zeigt das kalziumabhängige Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (orange) des Fluoreszenzfarbstoffs.

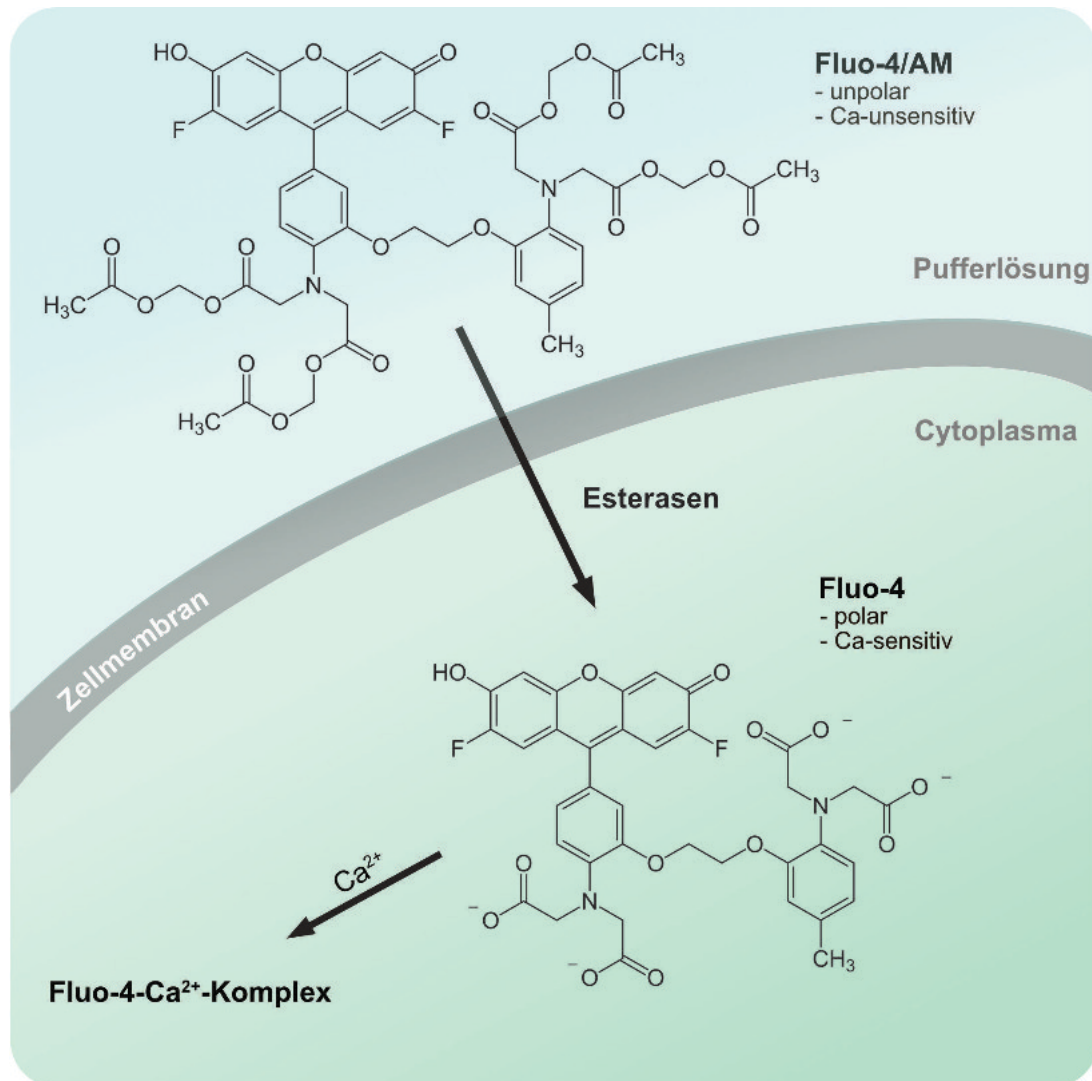
D: Übernommen u. modifiziert aus dem *Molecular Probes Handbook* (Johnson & Spencer, 2010)



Die Maxima der Absorptions- und Emissionsspektren von Fluo-4 (im Komplex mit Ca) liegen im Bereich des sichtbaren Lichts ( $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 506 \text{ nm}$ ), wodurch sich der Farbstoff gut zur Anregung mit einem Argon-Ionen-Laser bei 488 nm und Detektion bei  $>515 \text{ nm}$  eignet. Fluo-4 weist mit einem  $K_d(\text{Ca})$ -Wert von 345 nM (*in vitro*, 22°C) die höchste Affinität für Kalzium und den stärksten Ca-abhängigen Fluoreszenzintensitätsanstieg bei 488 nm Anregung innerhalb der Reihe der Fluo-X-Indikatoren auf (Gee et al., 2000; Johnson & Spence, 2010). Die Dissoziationskonstante wird nach Einbringung des Indikators in die Zellen von einer Reihe von Faktoren beeinflusst, wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, und Viskosität des Cytoplasmas/Nucleoplasmas, sowie der Interaktion mit Proteinen und weiteren Ionen. Dies führt dazu, dass der tatsächliche  $K_d(\text{Ca})$ -Wert *in vivo* signifikant höher als der Referenzwert *in vitro* liegt (Hagen et al., 2012; Ljubojevic et al., 2011; Plackic et al., 2016). Ohne eine *In-situ*-Kalibrierung können die gemessenen Fluoreszenzänderungen daher nicht für eine genaue quantitative Auswertung der Kalziumkonzentrationsänderungen herangezogen werden. Für eine semi-quantitative Auswertung werden die gemessenen Intensitätswerte durch den Ruhefluoreszenzwert geteilt, um auf diese Weise einer variierenden Beladungsstärke der einzelnen Zellen Rechnung zu tragen.

### 2.4.2 Beladung der Myozyten mit Fluo-4/AM

Fluo-4 liegt bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 als vierfach-negativ geladenes Polycarboxylat-Anion vor und kann in dieser Form Zellmembranen nur zu einem sehr geringen Anteil permeieren. Zur Anwendung kam daher Fluo-4 als Acetoxymethylester (Fluo-4/AM;  $\text{C}_{51}\text{H}_{50}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{23}$ ;  $M_r = 1096,95$ ; CAS-Nr.: 273221-67-3; Best.-Nr.: F14201, Invitrogene, Carlsbad, Kalifornien, USA) im sog. Ester-Beladungsverfahren (Abb. 2-7).



**Abbildung 2-7 Ester-Beladungsverfahren**

Fluo-4/AM ist durch die Maskierung der Carboxyl-Gruppen ungeladen und somit deutlich lipophiler als Fluo-4. Nach der Permeation der Zellmembran konvertieren unspezifische Esterasen im Cytosol den Acetoxymethylester zurück in das Polycarboxylat-Anion, wodurch der Farbstoff im Zellinneren verbleibt.

Fluo/4-AM, welches durch die Maskierung der Carboxylgruppen im Gegensatz zu Fluo-4 neutral geladen ist, weist keine Ca-Affinität mehr auf und besitzt auf Grund der deutlich höheren Lipophilie eine gute Membrangängigkeit. Beim Ester-Beladungsverfahren wird eine Fluo-4/AM-Lösung auf die Zellen gegeben, woraufhin der Farbstoff mittels Diffusion passiv in die Zellen gelangt, wo eine Spaltung in die Polycarboxylat-Form durch unspezifische Esterasen erfolgt. Der Fluoreszenzindikator kann nun den Komplex mit Kalzium ausbilden, während die hohe Polarität eine Rückdiffusion durch die Zellmembran verhindert und die Substanz intrazellulär fixiert und akkumulieren lässt (Hagen et al., 2012).

Die Substanz wurde in 20% Pluronic®F-127 /DMSO (Best.-Nr.: P3000MP, Invitrogene) gelöst und so eine 1 mM Stammlösung erzeugt. Pluronic ist ein nichtionisches Tensid und stellt chemisch ein Copolymer aus Ethylenoxid und Propylenoxid (= Poloxamer) dar. Die Zugabe erleichtert die Lösung des schlecht wasserlöslichen Fluoreszenz-indikators in physiologischen Medien (Johnson & Spencer, 2010). Vor der Anwendung wurde die Fluo-4/AM-Stammlösung mit der Mess-Tyrode auf eine Arbeitskonzentration von 8  $\mu$ M verdünnt. Die Mess-Tyrode (Tab. 2-8) stellt eine modifizierte Tyrode-Lösung dar und diente als Standard bei sämtlichen Versuchen (Kontroll-Lösung). Die verdünnte Fluo-4/AM-Lösung wurde auf die ausplattierten Kardiomyozyten gegeben und für 30 min (= Beladungszeit) einwirken gelassen. Danach wurde die Lösung abpipettiert und durch frische Mess-Tyrode ersetzt. Im Anschluss wurden die Zellen für eine weitere Zeitspanne von mindestens 20 min ruhen gelassen, um genügend Zeit für die Esterhydrolyse zu lassen.

**Tabelle 2-8 Mess-Tyrode (1 Liter, pH 7,4)**

Substanz	Konzentration (bei Lösungen)	Menge	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	(s)	8,182 g	Roth	140 mM
KCl	1 M	5 ml	Roth	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 M	0,5 ml	Sigma	0,5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 M	1,5 ml	Sigma	1,5 mM
HEPES	(s)	2,383 g	Roth	10 mM
Glucose x H <sub>2</sub> O	(s)	1,982 g	Roth	10 mM
NaOH	1 M	q.s. zur Einstellung des pH-Wertes	Roth	

## **2.4.3 Konfokales Imaging von subzellulären Kalziumtransienten**

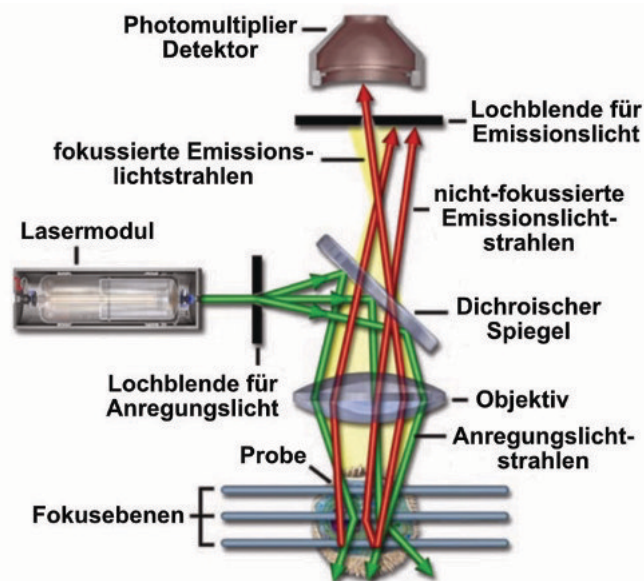
### **2.4.3.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop**

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (früher: Laserrastermikroskopie) stellt eine essenzielle Methode mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten in der biomedizinischen Forschung dar und revolutionierte die Fluoreszenzmikroskopie. Diese eignet sich zur Bildaufzeichnung (Imaging) von fixierten oder lebenden Zell- und Gewebepreparaten, innerhalb derer - je nach experimenteller Fragestellung - gewünschte Elemente und Zielstrukturen mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar und messbar gemacht werden können. Die Fluoreszenzmikroskopie mit einem Konfokalmikroskop erlaubt hierbei eine bessere räumliche Auflösung zu erreichen als es mit einem konventionellen Großfeldmikroskop möglich wäre. Bei einem einfachen optischen System, wie das innerhalb eines Lichtmikroskops, wird das Fluoreszenzlicht aus dem Untersuchungsbereich (fokussierte Emission) von den anderen fokalen Ebenen darunter und darüber (nicht-fokussierte Emission) überlagert und beeinflusst, wodurch die räumliche Auflösung verringert wird. Dies gilt besonders für Proben mit einer Dicke von  $>2\ \mu\text{m}$ . Das konfokale optische System ermöglicht die nicht-fokussierte Emission auszublenden und stellt auf diese Weise eine höhere laterale und axiale Auflösung bereit. Darüber hinaus dienen fokussierte Lichtstrahlen eines Lasers als Lichtquelle zur punktförmigen Anregung und erlauben ein präzises Abrastern der Probe (Paddock, 2000).

**Abbildung 2-8 Prinzip der Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie**

Der Aufbau und die grundlegenden Komponenten eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops sind auf schematische Weise dargestellt. Es lassen sich der Anregungsstrahlengang (grüne Pfeile) und der Beobachtungsstrahlengang (rote Pfeile) voneinander unterscheiden.

(modifiziert nach Claxton et al., 2006)



Das Prinzip der Konfokalmikroskopie wurde erstmals 1957 von Marvin Minsky an der Harvard Universität beschrieben und patentiert. In der Optik bezeichnet man zwei Systeme als „konfokal“, wenn sie einen gemeinsamen Brennpunkt besitzen. Dies bezieht sich im Falle des Konfokalmikroskops auf den Beleuchtungs- und Beobachtungsstrahlengang. Das mittels Laser erzeugte und mit einer Lochblende auf einen Punkt der Probe fokussierte Anregungslicht ist konfokal mit dem Abtastungspunkt, der mittels einer weiteren Lochblende das Emissionslicht aus der gleichen fokalen Ebene zum Detektor führt (Abb. 2-8). Das Laserlicht wird dabei im Beleuchtungsstrahlengang nach Passage der Blende über die Reflektion an einem dichroischen Spiegel auf eine definierte Fokusebene der Probe geleitet. Das hierdurch entstehende Emissionslicht kann nun den dichroischen Spiegel in Richtung des Detektors passieren, während von der Probe zurückgeworfenes Anregungslicht erneut vom Spiegel reflektiert wird. Nach der optionalen Passage eines oder mehrerer Interferenzfilter trifft das Emissionslicht auf die zweite Lochblende, die zur Erzeugung der Konfokalität auf den gleichen Brennpunkt eingestellt ist wie die erste Lochblende und das Licht erneut fokussiert. Danach trifft das Emissionslicht aus der definierten Fokusebene auf einen Photomultiplier, der es verstärkt, so dass ein Detektor das Signal zur Auswertung in Intensitätswerte konvertieren kann. Die Schlüsselkomponente ist hierbei die zweite Lochblende, welche die nicht-fokussierte Emission der mitangeregten Fokusebenen über und unter der konfokalen Ebene aus der Detektion heraushält und

nicht mit in das entstehende Bild einfließen lässt. Im Konfokalmikroskop können so optische Schnittebenen von geringer Dicke (z.B.  $1\ \mu\text{m}$ ) definiert und auf diese Weise subzelluläre Signale detektiert werden. Die hohe laterale Auflösung kommt darüber hinaus durch die punktuelle Anregung im Raster mit Hilfe des Lasers zustande.

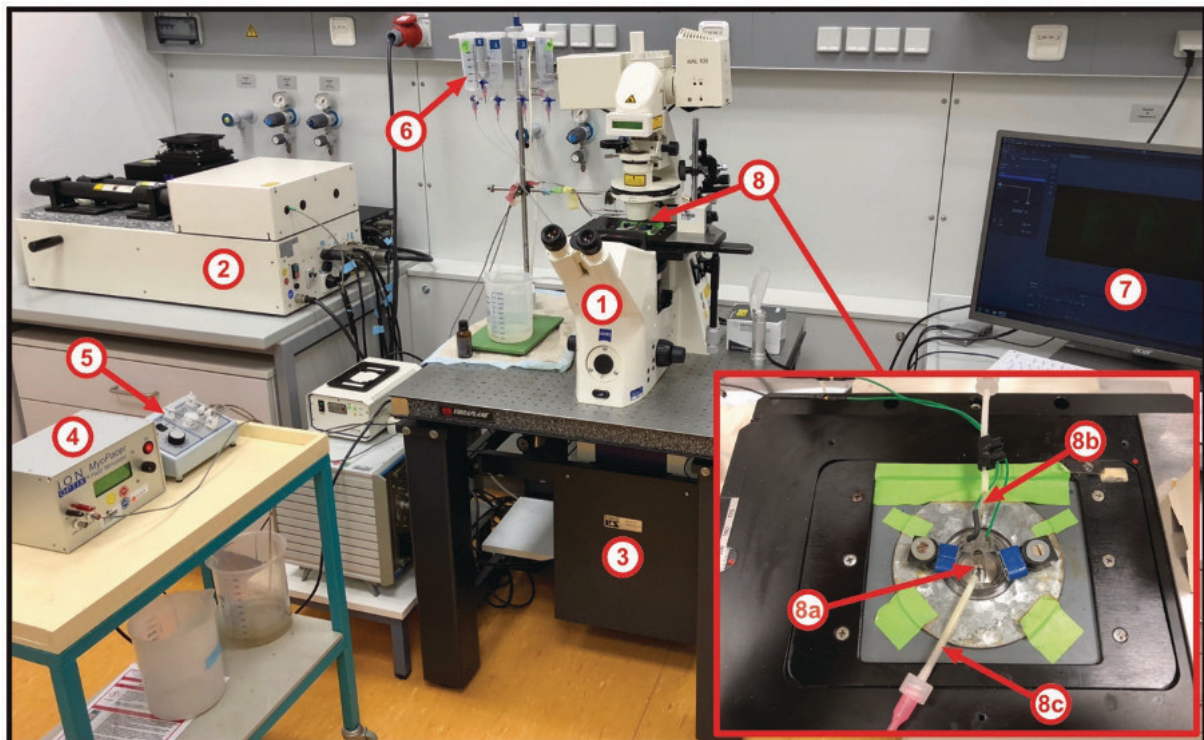
### 2.4.3.2 Aufnahme subzellulärer Kalziumtransienten in Ventrikelmyozyten

Die Aufnahme subzellulärer Kalziumtransienten erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Abb. 2-9). Als Lichtquelle zur Anregung kam ein Argon-Ionen-Laser (458 nm, 477 nm, 488 nm, 514 nm) zum Einsatz; das Emissionslicht wurde mit einem Ölimmersionsobjektiv (Plan-Apochromat, 63x/1,4 Oil DIC) gesammelt. Für die Aufnahmen wurde das Gerät im Linescan-Modus betrieben. Dabei wird eine definierte Linie vom Laser über einen gewählten Zeitraum repetitiv beleuchtet und gescannt. Die aufgenommene Zeitserie bestand aus 1600 unidirektionalen Linien (512 Pixel/Linie) mit einer Scandauer von jeweils 3,07 ms bei einer Bildtiefe von 12 Bit. Konfokalität wurde durch die Einstellung der Lochblende ( $140\ \mu\text{m}$ ) erreicht, wodurch eine optische Schnittebene von  $\sim 1\ \mu\text{m}$  Dicke aufgenommen wurde. Fluo-4 wurde mit Hilfe des Argon-Lasers bei 488 nm angeregt, während das emittierte Fluoreszenzlicht nach Passage eines Langpassfilters bei  $>505\ \text{nm}$  gesammelt und detektiert wurde.

Bei der vor Ort etablierten Linescan-Methode (Plackic et al., 2016) wird die Scanlinie durch einen Zellkern orthogonal zur Längsachse der Zelle positioniert und die konfokale Ebene in einen Z-Achsenbereich im Zentrum des Kerns gelegt (Abb. 3-1A). Auf diese Weise konnten simultan cyto- und nucleoplasmatische Kalziumtransienten aufgenommen werden. Ein weiterer Vorteil der Linescan-Methode besteht darin, dass auch schnelle Änderungen der Fluoreszenzintensität mit einer guten zeitlichen Auflösung registriert werden können.



Die im Kulturschälchen mit Glasboden ausplattierten und mit Fluoreszenzindikator beladenen Zellen wurden bei Raumtemperatur mit Mess-Tyrode superfundiert. Zur Stimulation der Kardiomyozyten wurde ein elektrisches Feld (40 V) über zwei Platinelektroden angelegt. Mit einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz wurden die Myozyten zur Kontraktion angeregt.



**Abbildung 2-9 Zeiss LSM 510 Setup**

(1) Axiovert 100 M Lichtmikroskop, (2) Lasermodul, (3) LSM-510-Scanmodul, (4) MyoPacer zur elektrischen Stimulation, (5) Peristaltikpumpe zur Absaugung, (6) Reservoirs des schwerkraftgesteuerten Superfusionssystems (7) Computer und Monitor mit Aufnahmesoftware, (8) Proben-Plattform mit eingebrachtem Kulturschälchen und Kammereinsatz mit (8a) Superfusionskammer mit Platinelektroden, (8b) Kammerzulauf und (8c) Absaugstutzen.

## 2.4.4 Auswertung der konfokalen Messungen

Zur Auswertung der Linescan-Bilder wurde die Applikation ImageJ (gemeinfreie Software, NIH, Bethesda, Maryland, USA) verwendet. Nach einer Subtraktion des Hintergrundfluoreszenzsignals und einmaliger Glättung, wurde aus der Fluoreszenzspur einer jeden Zeitserie ein repräsentativer Kalziumtransient (CaT) ausgewählt. Für die Charakterisierung der Kalziumtransienten wurden folgende Parameter verwendet (Abb. 2-10): Um Änderungen in der Kalziumkonzentration einzuschätzen, wurden das diastolische Ca ( $F_0$ ), welches das basale Fluoreszenzsignal darstellt, und das systolische Ca ( $F$ ), welches dem maximalen Fluoreszenzsignal entspricht, bestimmt. Aus der Differenz von  $F$  und  $F_0$  errechnet sich die Amplitude des CaT (CaT-Amplitude,  $dF$ ). Zur Charakterisierung der Kinetik dienten die Anstiegszeit (*time to peak*, TTP), welche die Zeit vom Beginn des Anstiegs bis zum Erreichen des Maximums darstellt, und die Abfallszeitkonstante (*tau of decay*,  $\tau$ ), welche unter Annahme eines exponentiellen Abfalls der CaT der Zeitkonstante der zugehörigen Funktion entspricht. Die Werte für  $F$ ,  $F_0$  und ggf.  $dF$  wurden auf die Ruhefluoreszenz ( $F_{\text{rest}}$ ) normalisiert, die nach  $>1$  min ohne Stimulation gemessen wurde.

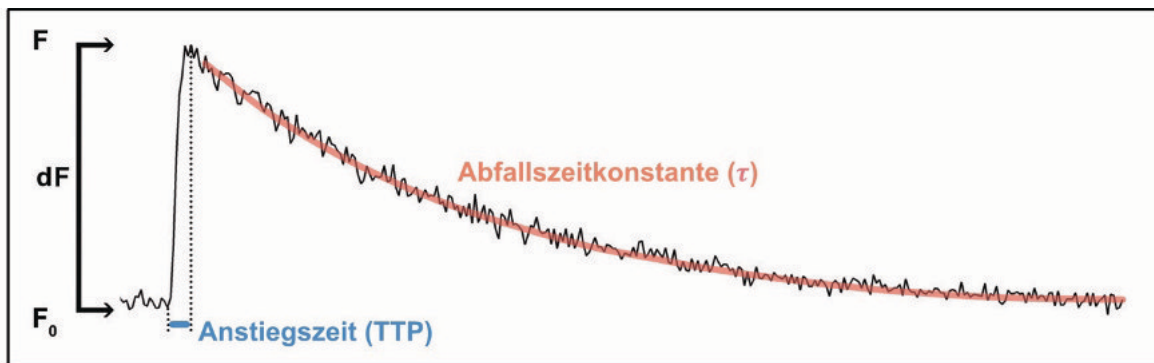


Abbildung 2-10 Auswertung der Kalziumtransienten

Zur Auswertung der Kalziumtransienten (CaT) wurde das systolische Ca ( $F$ ) als Maximum und das diastolische Ca ( $F_0$ ) als Minimum der Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Differenz stellt die Amplitude des CaT ( $dF$ ) dar. Zur Charakterisierung der Kinetik wurde die Zeitspanne vom Beginn des Anstiegs bis zum Erreichen des Maximums, die Anstiegszeit (TTP), bestimmt, sowie die Abfallszeitkonstante ( $\tau$ ) der Exponentialfunktion, welche den Abfall des CaT beschreibt.



## 2.4.5 Messung von Kalziumbeladung und -freisetzung aus dem SR und den perinucleären Speichern

Die Messung der Kalziumbeladung und -freisetzung der intrazellulären Kalziumspeicher wurde mit Hilfe einer Koffein-Bolusapplikation durchgeführt. Hierbei wurde eine 10 mM Koffeinlösung direkt in die Superfusionskammer des Kulturschälchens möglichst dicht an die betreffende Zelle gegeben. Dabei wurde die elektrische Stimulation kurz vor der Applikation gestoppt, um den Abfall auf ein diastolisches Kalziumniveau zu bewirken. Der durch die koffeinabhängige Freisetzung des Speicherkalziums erzeugte Kalziumtransient ( $\text{CaT}_{\text{koff}}$ ) wurde zur weiteren Auswertung herangezogen. Hierbei wurde als Parameter zur Charakterisierung der Ca-Freisetzung die fraktionelle Freisetzung (*fractional release*, FR) verwendet. Diese wurde als Quotient aus der Amplitude eines elektrisch stimulierten CaT unmittelbar vor der Koffeinapplikation (Referenz-CaT,  $\text{CaT}_{\text{ref}}$ ,  $\text{dF}_{\text{ref}}$ ) und der Amplitude des Koffeintransienten ( $\text{CaT}_{\text{koff}}$ ,  $\text{dF}_{\text{koff}}$ ) jeweils für Cytoplasma ( $\text{dF}_{\text{ref,zyto}} / \text{dF}_{\text{koff,zyto}}$ ) und Nucleus ( $\text{dF}_{\text{ref,nuc}} / \text{dF}_{\text{koff,nuc}}$ ) errechnet. Die FR-Werte des cytosolischen Signals spiegeln hierbei das SR wider, während das nucleäre Signal den perinucleären Speichern entspricht. Darüber hinaus wurden zur Einschätzung der Ca-Beladung die  $\text{dCaT}_{\text{koff}}$ -Werte normalisiert auf  $F_{\text{rest}}$  berechnet. Daraus ergab sich jeweils die Beladung des SR ( $\text{dF}_{\text{koff,zyto}} / F_{\text{rest,zyto}}$ ) und der perinucleären Speicher (PN-Beladung,  $\text{dF}_{\text{koff,nuc}} / F_{\text{rest,nuc}}$ ).

## 2.5 Statistik

Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler für  $n$  Kardiomyozyten aus  $N$  Tieren angegeben. Die statistische Analyse wurde in der Applikation GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mittels D'Agostino-Pearson-Test. Für gepaarte Vergleiche innerhalb einer normalverteilten Gruppe wurde ein gepaarter t-Test und innerhalb einer nicht-normalverteilten Gruppe ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Für Vergleiche zwischen zwei ungepaarten normalverteilten Gruppen wurde ein

ungepaarter t-Test und bei nicht-normalverteilten Gruppen ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewandt. Wenn mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, kam eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett-Post-Hoc-Test oder ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Post-Hoc-Test für multiple Mittelwertvergleiche zum Einsatz. Hierbei wurden P-Werte  $<0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. Korrelationsanalysen wurden unter Berechnung eines Rangkorrelationskoeffizienten ( $r$ ) nach Spearman durchgeführt. Hierbei wurde ein  $r$ -Wert als signifikant von Null verschieden betrachtet, wenn  $P < 0,05$  war. Bei vorliegender signifikanter Korrelation zweier Parameter wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt.

## 2.6 Datenaufbereitung und Design der Arbeit

Für die Aufbereitung und Darstellung der Daten und Ergebnisse sowie für das Design und Layout der vorliegenden Arbeit wurden eine Reihe von Applikationen verwendet, die im Folgenden aufgeführt werden. Die vom Mikroskop erzeugten Rohdaten wurden in ImageJ analysiert und in Übersichtstabellen in MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) gesammelt. Die weitere Auswertung und graphische Aufarbeitung der Daten erfolgte in GraphPad Prism. Chemische Strukturformeln wurden mit ChemDraw Prime (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) gezeichnet. In der Arbeit abgebildete Tabellen wurden in Numbers (Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA) erstellt. Für die Bearbeitung von Fotomaterial wurde Affinity Photo (Serif Europe Ltd, Nottingham, UK) verwendet. Das finale Layout der Abbildungen sowie das Design von Schemazeichnungen geschah in Affinity Designer (Serif Europe Ltd, Nottingham, UK). Zur Literaturrecherche und Archivierung von wissenschaftlichen Texten, sowie zur Erstellung eines Literaturverzeichnisses diente die Applikation Papers (Digital Science & Research Solutions Inc., London, UK). Das Manuskript zur vorliegenden Arbeit wurde in Scrivener (Literature & Latte Ltd, Truro, UK) erstellt, nach MS Word (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) exportiert und zur Erstellung einer Druckversion mit PDF-Expert (Readdle Inc., Odesa, Ukraine) konvertiert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Studien am physiologischen Modell

Als Modell zur Charakterisierung der physiologischen Kernkalziumregulation dienten Ventrikeldomyozyten von 12-18 Wochen alten WKY-Ratten. Diese sind als gesunde Kontrolltiere zu den SHR kommerziell erhältlich.

In den Studien am physiologischen Modell wurden drei Aspekte der Kernkalziumregulation untersucht. Zuerst wurden Interventionen zur Erhöhung bzw. Erniedrigung des cytoplasmatischen CaT durchgeführt, um so über einen weiten Ca-Konzentrationsbereich die (1) Rolle des cytoplasmatischen Kalziums auf den nucleären CaT zu untersuchen. Im Weiteren wurde mit Hilfe des pharmakologischen Hemmstoffs Thapsigargin die (2) Rolle der SERCA in der Kernkalziumregulation beleuchtet. Schließlich wurde eine Studie zur koffein-induzierten Ca-Speicher-Entleerung durchgeführt, um die (3) Rolle der perinucleären Ca-Speicher für den nucleären Ca-Anstieg aufzuklären.

#### 3.1.1 Effekte von erniedrigten cytoplasmatischen Ca-Konzentrationen auf den nucleären CaT

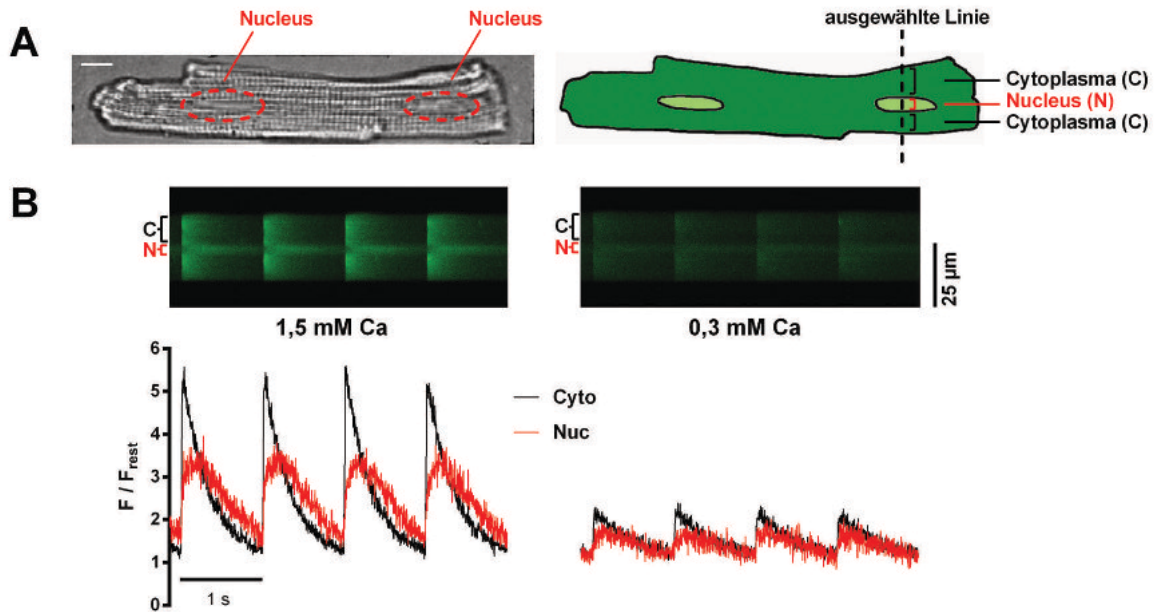
##### 3.1.1.1 Änderung des cytoplasmatischen CaT durch Verminderung der extrazellulären Ca-Konzentration

Die frisch isolierten Kardiomyozyten wurden mit Fluo-4 beladen und am Laser-Scanning-Konfokalmikroskop untersucht. Die Zellen wurden zur Herstellung von Kontrollbedingungen mit Mess-Tyrode (1,5 mM Ca; Ca 1,5) superfundiert und bei einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert. Subzelluläre CaT wurden in einer Linescan-Zeitreihe aufgenommen. Hierbei wurde die Scan-Linie so gewählt, dass sie orthogonal

zur Längsachse der Zelle liegt und dabei einen Zellkern schneidet (Abb. 3-1A). Dies erlaubt die simultane Aufnahme eines nucleären und cytoplasmatischen Fluo-4-Fluoreszenzsignals. In der linken Spalte von Abb. 3-1B ist die originale Fluoreszenzaufnahme einer Zeitserie unter Kontrollbedingungen dargestellt. Es lassen sich elektrisch stimulierte CaT erkennen; hierbei entspricht eine Erhöhung der Helligkeit des Fluoreszenzlichts einem Anstieg der Ca-Konzentration. Das nucleoplasmatische Fluoreszenzsignal (N, Nuc, rot) lässt sich dabei sichtbar vom cytoplasmatischen Fluoreszenzsignal (C, Cyto, schwarz) unterscheiden und weist dabei eine charakteristische Verzögerung beim Intensitätsabfall auf, die mit der längeren Abfallszeit des nucleären CaT zusammenhängt. Dies lässt sich ebenfalls in der darunter dargestellten, normalisierten Fluoreszenzsignalspur ( $F/F_{\text{rest}}$ ) erkennen.

Um den Effekt von verminderten cytoplasmatischen Ca-Spiegeln auf den nucleären CaT zu charakterisieren, wurden die Zellen einer extrazellulären Ca-Konzentration von 0,3 mM ausgesetzt. Die Änderung der extrazellulären Ca-Konzentration stellt hierbei ein elegantes Mittel dar, mit dessen Hilfe das cytoplasmatische Kalzium moduliert werden kann, ohne dabei größere Manipulationen an intrazellulären Signalwegen in Kauf nehmen zu müssen.

Nach Umschalten des Superfusionssystems auf eine Mess-Tyrode mit 0,3 mM Ca (Ca 0,3) wurde den Zellen 4-7 min Zeit gelassen, um einen neuen Steady-State zu erreichen. Die Intervention führte zu einer eindrucksvollen Verkleinerung der cytosolischen und nucleären CaT (Abb. 3-1B, rechte Spalte). Die extrazelluläre Konzentration von 0,3 mM Ca wurde aus einem Vorversuch ermittelt und setzte sich gegenüber höheren bzw. niedrigeren Vergleichskonzentrationen durch. Ziel war es einen maximalen Einfluss auf den cytosolischen CaT bei gleichzeitigem Erhalt der Kontraktionsfähigkeit der Zellen zu erreichen.



**Abbildung 3-1 Elektrisch stimulierte CaT bei 1,5 mM und 0,3 mM extrazellulärer Ca-Konzentration**

(A) Linke Spalte: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Ventrikelsmyozyten aus einer WKY-Ratte mit roten Linien, welche die Zellkerne markieren; die weiße Maßstabsleiste repräsentiert 10  $\mu\text{m}$ . Rechte Spalte: Schematische Darstellung eines Myozyten zur Demonstration der Scanlinien-Platzierung und der resultierenden Scanbereiche. (B) Anderer Myozyt. Linke Spalte: Original Linescan-Aufnahme von elektrisch stimulierten cytoplasmatischen (C, Cyto, schwarz) und nucleoplasmatischen (N, Nuc, rot) CaT bei 1,5 mM extrazellulärer  $[Ca^{2+}]$  und darunter die zugehörigen normalisierten Fluoreszenzintensitätsspurten. Rechte Spalte: Linescan-Fluoreszenzbild und korrespondierende Spuren von CaT bei 0,3 mM extrazellulärer  $[Ca^{2+}]$ .

### 3.1.1.2 Die Verringerung des cytoplasmatischen CaT führt zu einer Verkleinerung des nucleären CaT

Beim Vergleich der Mittelwerte in Abb. 3-2 zeigte sich eine signifikante Verringerung des systolischen Ca sowohl im cytoplasmatischen als auch im nucleären CaT auf etwa 50% der Kontrolle (49% im Cytoplasma, von  $5,49 \pm 0,38$  auf  $2,67 \pm 0,26$   $F/F_{\text{rest}}$ ).

$P < 0,001$ , und 56% im Nucleus, von  $4,14 \pm 0,19$  auf  $2,32 \pm 0,17$   $F/F_{\text{rest}}$   $P < 0,001$ ;  $n/N = 19/7$ ). Ein Effekt auf das diastolische Ca war hingegen nur im Zellkern zu finden, wo sich ebenfalls ein Abfall zeigte (von  $1,75 \pm 0,06$  auf  $1,39 \pm 0,08$   $F_0/F_{\text{rest}}$ ,  $P < 0,01$ ;  $n/N = 19/7$ ). Darüber hinaus konnten Änderungen bei den kinetischen Parametern der CaT beobachtet werden. Die Anstiegszeit (TTP) verlängerte sich in beiden Kompartimenten jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (im Cytosol von  $40 \pm 3$  auf  $52 \pm 6$  ms,  $P = 0,066$ , und im Kern von  $182 \pm 12$  auf  $211 \pm 24$  ms,  $P = 0,213$ ;  $n/N = 19/7$ ). Die Abfallszeitkonstante ( $\tau$ ) war im Cytoplasma signifikant erhöht (um 65% von  $401 \pm 27$  auf  $662 \pm 75$  ms,  $P < 0,001$ ), jedoch nicht im Nucleus (von  $1212 \pm 96$  auf  $1394 \pm 147$  ms,  $P = 0,361$ ;  $n/N = 19/7$ ). Diese Ergebnisse zeigen eine Verringerung des systolischen Ca im Zellkern als Folge einer Verminderung des systolischen Ca im Cytosol. Hiervon lässt sich ableiten, dass der systolische nucleoplasmatische CaT dem systolischen cytoplasmatischen CaT folgt und ebenfalls kleiner wird, was vermutlich auf eine verringerte passive Diffusion von Ca durch die Kernporen zurückzuführen ist.

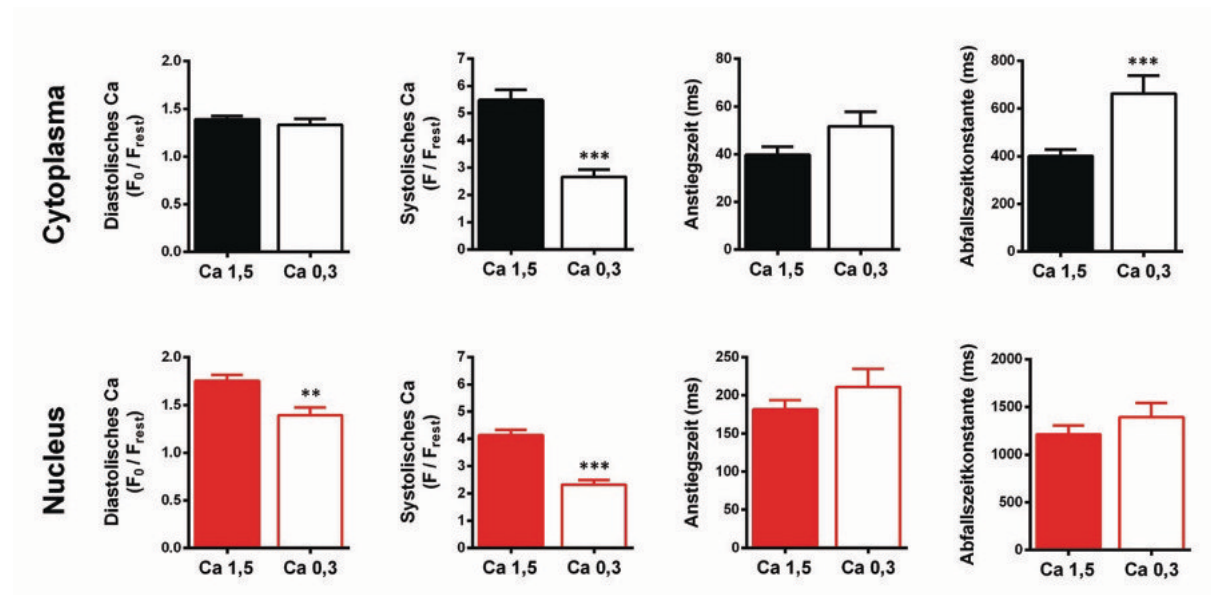


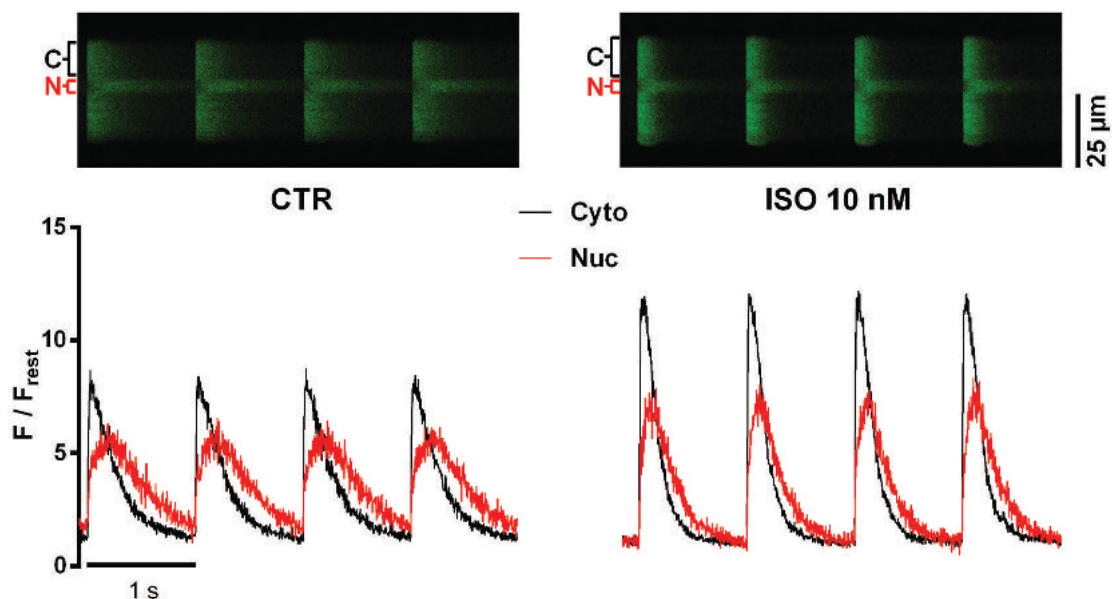
Abbildung 3-2 Vergleich der CaT bei 1,5 mM und 0,3 mM extrazellulärer Ca-Konzentration

Mittelwerte der cyto- und nucleoplasmatischen CaT-Parameter: Diastolisches Ca ( $F_0/F_{\text{rest}}$ ), systolisches Ca ( $F/F_{\text{rest}}$ ), Anstiegszeit (TTP) und Abfallszeitkonstante ( $\tau$ ) bei 1,5 mM und 0,3 mM extrazellulärer  $[Ca^{2+}]$ . \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n/N = 19/7$ .

### 3.1.2 Effekte von erhöhten cytoplasmatischen Ca-Konzentrationen auf den nucleären CaT

#### 3.1.2.1 Modulation des cytoplasmatischen CaT durch Stimulation $\beta$ -adrenerger Rezeptoren

Als nächstes wurden die Effekte erhöhter cytoplasmatischer CaT auf die nucleäre Ca-Regulation untersucht. Hierzu wurde Isoprenalin (ISO, 10 nM) verwendet und über die Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren und nachfolgender Aktivierung des cAMP-Signalwegs ein gut bekannter Mechanismus (Bers, 2002; Ginsburg & Bers, 2004) genutzt, um die intrazelluläre Ca-Konzentration in den Kardiomyozyten zu erhöhen.



**Abbildung 3-3** Effekte auf cyto- und nucleoplasmatische CaT bei der Stimulation mit Isoprenalin

Linke Spalte: Originale Linescan-Registrierung von elektrisch stimulierten cytoplasmatischen (C, Cyto, schwarz) und nukleoplasmatischen (N, Nuc, rot) CaT unter Kontrollbedingungen (CTR) und darunter die zugehörigen normalisierten Fluoreszenzintensitätsspuren. Rechte Spalte: Linescan-Fluoreszenzbild und korrespondierende normalisierte Spuren nach 5 min Isoprenalin (10 nM)-Exposition.

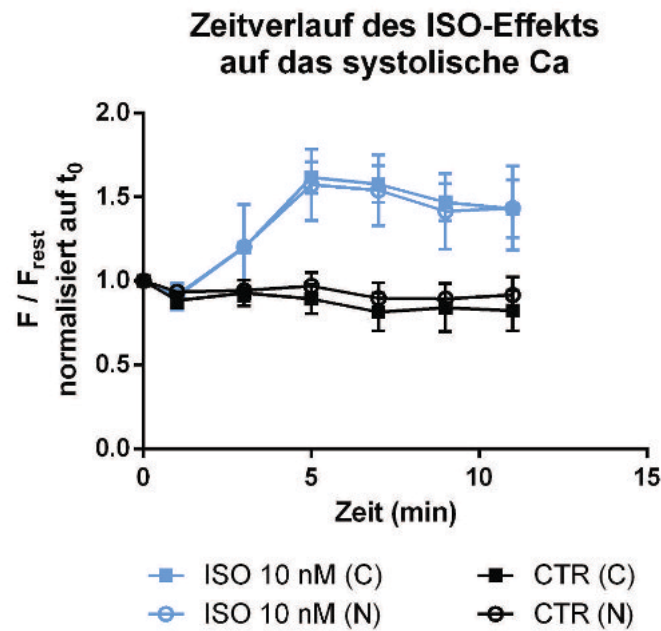


Nach einer basalen Aufnahme der CaT bei Superfusion mit Mess-Tyrode (Kontrollbedingungen) wurde auf eine ISO-Lösung (10 nM in Mess-Tyrode) umgestellt. Abb. 3-3 zeigt die originalen Linescanbilder und korrespondierenden Fluoreszenzsignalspuren der CaT unter Kontrollbedingungen (CTR, linke Spalte) und 5 min nach dem Beginn der ISO-Applikation (ISO, rechte Spalte). Unter ISO ließ sich ein ausgeprägter Anstieg des cytoplasmatischen und nucleoplasmatischen systolischen Fluoreszenzsignals beobachten, während das diastolische Signal abnahm. In beiden Kompartimenten (Cyto und Nuc) zeigte sich eine Beschleunigung der Abfallszeit der CaT.

### **3.1.2.2 Zeitabhängiger Effekt der Isoprenalin-Applikation**

Der Isoprenalin-Effekt auf den CaT war zeitabhängig und daher war es wichtig für die Studie, einen Zeitpunkt für vergleichende Betrachtungen zu ermitteln. Zur Bestimmung eines geeigneten Zeitpunktes wurde in einem Pilotexperiment ( $n/N = 3/3$ ) ein Zeitverlauf des ISO-Effekts (Abb. 3-4) aufgenommen. Innerhalb dieser Serie zeigten die Zellen den steilsten Anstieg des systolischen Ca zwischen 3 und 5 min nach Beginn der ISO-Applikation und erreichten ein Maximum bei etwa 5 min. Ein früher Vergleichszeitpunkt innerhalb des Bereichs des steilsten Anstiegs (3-5 min) und dicht am maximalen Effekt war für die Analysen zu bevorzugen, da mit zunehmendem zeitlichen Voranschreiten des ISO-Effekts die Häufigkeit des Auftretens ungewollter, spontaner Ca-Freisetzungen und arrhythmischer Kontraktionen deutlich zunahm. Die unbehandelten Kontrollmyozyten (CTR,  $n/N = 4/1$ ) zeigten nahezu konstante systolische CaT über den gesamten Beobachtungszeitraum von 12 min.





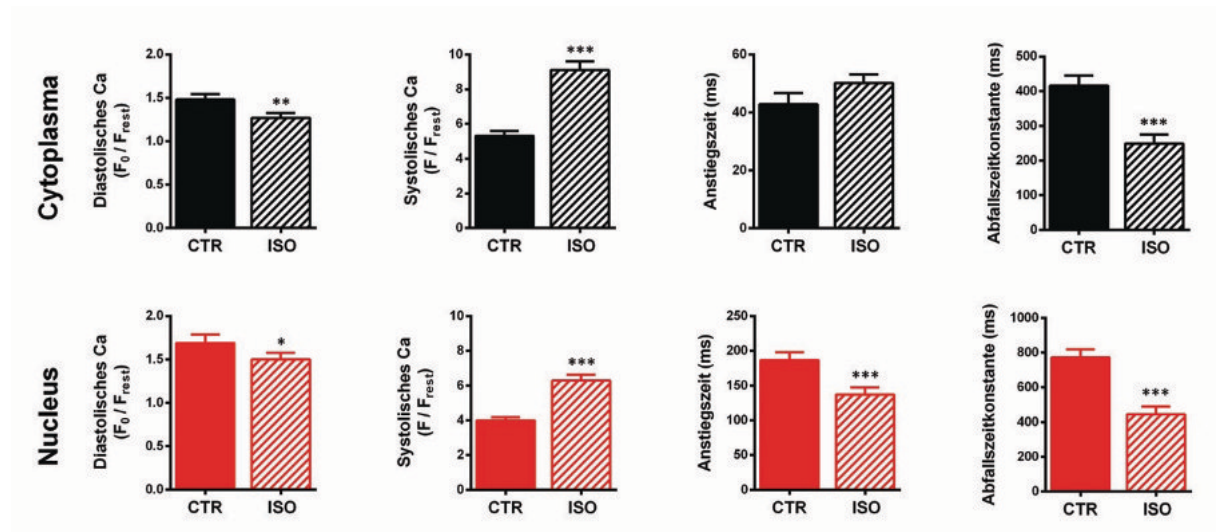
**Abbildung 3-4 Charakterisierung des Zeitverlaufs des Isoprenalineffekts**

Dargestellt ist der Verlauf des auf den Startzeitpunkt ( $t_0$ ) normalisierten mittleren systolischen Ca nach ISO-Applikation im Pilotexperiment (ISO,  $n/N = 3/3$ ) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (CTR,  $n/N = 4/1$ ).

### 3.1.2.3 Die Erhöhung des cytoplasmatischen CaT führt zu einer Vergrößerung des nucleären CaT

Der Vergleich der Mittelwerte der CaT (Abb. 3-5) vor (CTR) und nach (ISO) ISO-Gabe weist auf einen beträchtlichen Anstieg des systolischen cytoplasmatischen Ca ( $\text{Ca}_{\text{cyto}}$ ) sowie des nucleoplasmatischen Ca ( $\text{Ca}_{\text{nuc}}$ ) hin. Hier fand sich eine Zunahme des systolischen  $\text{Ca}_{\text{cyto}}$  von 72% (von  $5,31 \pm 0,29$  auf  $9,11 \pm 0,50$   $F/F_{\text{rest}}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 30/7$ ), während das systolische  $\text{Ca}_{\text{nuc}}$  um 58% (von  $3,99 \pm 0,20$  auf  $6,29 \pm 0,33$   $F/F_{\text{rest}}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 30/7$ ) anstieg. Weiterhin zu beobachten war eine Verringerung des diastolischen Ca sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern (um 17% im Cytoplasma von  $1,48 \pm 0,06$  auf  $1,27 \pm 0,06$   $F_0/F_{\text{rest}}$ ,  $P < 0,01$ ;  $n/N = 30/7$  und um 13% im Nucleus von  $1,69 \pm 0,09$  auf  $1,50 \pm 0,08$   $F_0/F_{\text{rest}}$ ,  $P < 0,05$ ;  $n/N = 30/7$ ).

Ebenfalls betroffen von den Effekten der ISO-Behandlung zeigten sich die kinetischen Parameter. Die Anstiegszeit im Nucleus ( $TTP_{nuc}$ ) war signifikant verkürzt (von  $187 \pm 11$  auf  $137 \pm 10$  ms,  $P < 0,01$ ;  $n/N = 30/7$ ), während die Anstiegszeit im Cytoplasma ( $TTP_{cyto}$ ) einen gegensätzlichen Trend (von  $43 \pm 4$  auf  $50 \pm 10$  ms,  $P = 0,066$ ;  $n/N = 30/7$ ) aufwies. Dahingegen zeigte sich eine beschleunigte Abfallszeit der CaT konsistent in beiden Kompartimenten, was sich in einer Verringerung der  $\tau$ -Werte um  $\sim 40\%$  ( $\tau_{cyto}$  von  $416 \pm 29$  auf  $249 \pm 26$  ms,  $P < 0,001$ , und  $\tau_{nuc}$  von  $773 \pm 46$  auf  $446 \pm 45$  ms,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 30/7$ ) widerspiegelte.



**Abbildung 3-5 Charakterisierung des Isoprenalineffekts auf die CaT**

Mittelwerte der cyto- und nucleoplasmatischen CaT-Parameter vor (CTR) und nach 5 min Isoprenalin-(10 nM)-Exposition. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n/N = 30/7$ .

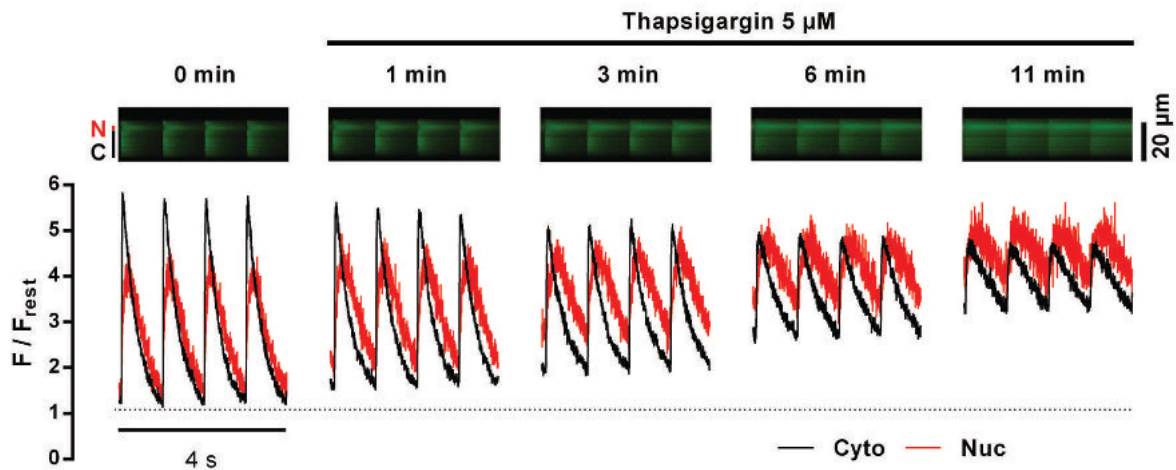
Der in dieser Versuchsserie beobachtete Anstieg des systolischen Ca und die schnellere Abfallskinetik der cytoplasmatischen CaT sind wahrscheinlich auf eine PKA- und CaMKII-vermittelte Erhöhung des Triggerkalziums und eine Erhöhung der SERCA-Aktivität zurückzuführen (Bers, 2001; 2002). Der Zellkern hingegen schien auf eine ganz ähnliche Weise betroffen zu sein. Diese Effekte sind möglicherweise durch den systolischen Ca-Anstieg und die beschleunigten CaT im Cytoplasma sowie eine gesteigerte SERCA-Aktivität in der Kernhülle bedingt.

### 3.1.3 Modulation der nucleären Ca-Regulation mittels Hemmung der SERCA-Pumpe

#### 3.1.3.1 Effekte der Thapsigargin-Applikation

Aus den zuvor beschriebenen Versuchsserien ging hervor, dass der nucleoplasmatische CaT den Änderungen des cytoplasmatischen CaT über einen weiten Ca-Konzentrationsbereich hinweg folgt, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Als ein möglicher Faktor kommt die passive Diffusion von Ca durch Kernporen in Frage, während weiterhin eine direkte oder indirekte Beteiligung von Ca-regulierenden Proteinen berücksichtigt werden muss. Es lässt sich vermuten, dass ein Teil der ISO-vermittelten Effekte auf die Stimulation der SERCA zurückzuführen ist, welche an der deutlich beschleunigten Abfallskinetik der cytoplasmatischen CaT zu erkennen war. Daraus ergibt sich die Frage nach der Rolle der SERCA und der Bedeutung ihrer Aktivität für die Kernkalzium-Regulation. Nach der Stimulation mittels ISO war die Hemmung der SERCA-Funktion ein logisches Folgeexperiment. Hierzu wurde Thapsigargin (TG) als spezifischer, irreversibler Inhibitor der SERCA verwendet.

Die Ventrikelzellen wurden mit TG (5  $\mu$ M in Mess-Tyrode) superfundiert. In Abb. 3-6 sind die originalen Fluoreszenzregistrierungen und korrespondierende Fluoreszenzsignalspuren vor und während der TG-Applikation zu unterschiedlichen Messzeitpunkten dargestellt. Es zeigten sich zeitabhängige TG-Effekte; mit voranschreitender Expositionszeit erhöhte sich das diastolische Ca sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. Das systolische Ca stieg dagegen nur im Nucleus an, während das systolische  $Ca_{cyto}$  keine signifikanten Änderungen zeigte. Dies, zusammen mit dem Anstieg im diastolischen  $Ca_{cyto}$  führte dazu, dass die Amplitude der cytoplasmatischen CaT kleiner wurde. Darüber hinaus ließ sich eine deutliche Verlangsamung der Abfallszeit beobachten, die sich bereits beim Betrachten der Fluoreszenzbilder erkennen lässt, in denen ab ~6 min die Helligkeit sichtbar langsamer abnimmt. Weiterhin wurde beobachtet, dass sich der exponentielle Abfall unter TG zu einem linearen Abfall wandelte (siehe bei 11 min).

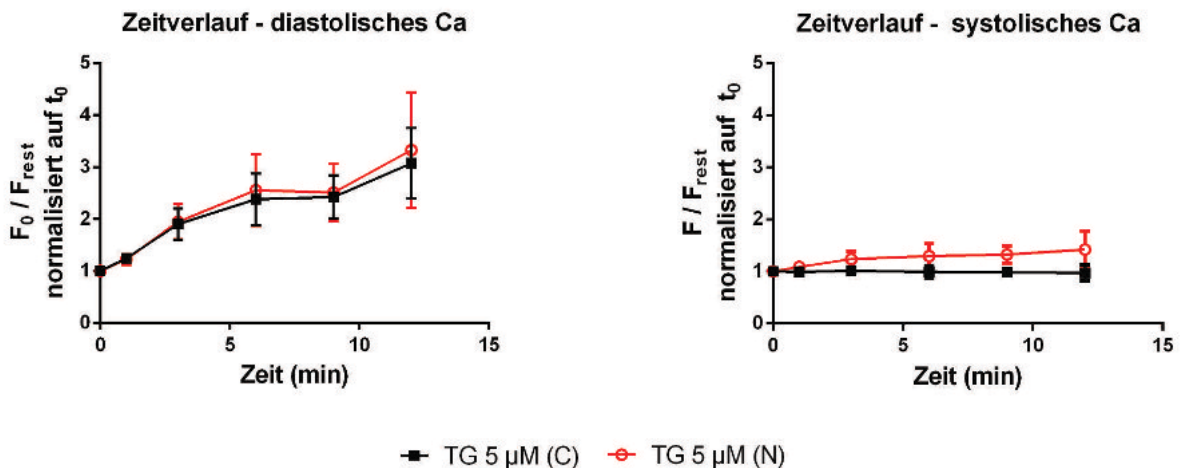


**Abbildung 3-6 Cyto- und nucleoplasmatische CaT während der SERCA-Hemmung mit Thapsigargin**

Linescan-Aufnahmen von elektrisch stimulierten cytoplasmatischen (C, Cyto, schwarz) und nucleoplasmatischen (N, Nuc, rot) CaT zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Applikation von Thapsigargin ( $5 \mu\text{M}$ ). Die Fluoreszenzbilder (obere Zeile) und die korrespondierenden normalisierten Intensitätsspurten (untere Zeile) zeigen einen zeitabhängigen Anstieg des diastolischen Ca und eine Verlangsamung der Abfallskinetik der CaT.

### 3.1.3.2 Zeitverlauf des Thapsigargin-Effekts und limitierende Faktoren

Eine zu Anfang aufgenommene kleine Gruppe von Zellen ( $n/N = 5/1$ ) diente zur Untersuchung des Zeitverlaufs des TG-Effekts (Abb. 3-7), um einen geeigneten Vergleichszeitpunkt zu bestimmen. Untersucht wurden dabei die Parameter systolisches und diastolisches Ca, welche zur Darstellung der relativen Änderung normalisiert auf den Zeitpunkt 0 min ( $t_0$ ) dargestellt sind.



**Abbildung 3-7 Zeitverlauf des Thapsigargineffekts**

Vorversuche ( $n/N = 5/1$ ) zur Charakterisierung des Zeitverlaufs der TG-Effekte. Die Mittelwerte des cyto- und nucleoplasmatischen diastolischen Ca (links), normalisiert auf  $t_0$ , zeigen einen konstanten Anstieg über die Zeit, wohingegen das systolische Ca (rechts) nur im Zellkern leicht ansteigt.

Während das systolische  $Ca_{cyto}$  einen relativ konstanten Verlauf aufweist, zeigte das diastolische Ca einen progredienten Anstieg mit zunehmender Zeit. Dies führte dazu, dass die Aufnahmen nur bis zu einem Zeitpunkt zwischen etwa 12 und 18 min auswertbar waren. In diesem Bereich wurde ein maximaler TG-Effekt erreicht, an dem bei sehr hohen diastolischen  $Ca_{cyto}$ -Spiegeln die Zellen keine CaT mehr aufwiesen und keine Kontraktionen mehr auslösbar waren. Dieser Effekt stimmt mit den Angaben in der Literatur überein (Kirby et al., 1992; Wrzosek et al., 1992). Das Ziel war jedoch, einen Vergleichszeitpunkt zu finden, bei dem Kontraktilität und CaT so gut erhalten waren, dass letztere noch gut auswertbar waren. Daher wurde das ansteigende diastolische  $Ca_{cyto}$  als Surrogatparameter für die Stärke des TG-Effekts verwendet und ein Zeitpunkt bei etwa halbmaximalem Effekt gewählt, der sich im Bereich von 4 bis 7 min nach Beginn der TG-Applikation befand.

### 3.1.3.3 Erhöhung des diastolischen Ca und Verlangsamung des CaT in beiden Kompartimenten als Folge der SERCA-Inhibition

Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Abb. 3-8 zusammengefasst. Es wurde eine Verdoppelung des diastolischen  $\text{Ca}_{\text{cyto}}$  (von  $1,38 \pm 0,07$  auf  $2,77 \pm 0,22 F_0/F_{\text{rest}}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 39/13$ ) gefunden. Auch im Zellkern zeigten sich signifikant erhöhte diastolische Ca-Spiegel unter der TG-Behandlung (von  $1,87 \pm 0,11$  auf  $3,45 \pm 0,27 F_0/F_{\text{rest}}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 39/13$ ). Die TTP war in beiden Kompartimenten verlangsamt ( $\text{TTP}_{\text{cyto}}$  von  $49 \pm 4$  auf  $115 \pm 9$  ms,  $P < 0,001$ ;  $\text{TTP}_{\text{nuc}}$  von  $183 \pm 9$  auf  $249 \pm 16$  ms,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 39/13$ ). Im Gegensatz dazu ließ sich beim systolischen Ca im Cytoplasma keine Änderung beobachten, wohingegen im Nucleus eine signifikante Erhöhung zu finden war. Weiterhin war die Abfallszeit der CaT beeinträchtigt. Die Abfallszeitkonstante  $\tau$  konnte jedoch nicht ausgewertet werden, da der Abfall zum Vergleichszeitpunkt unter TG einen annähernd linearen Verlauf angenommen hatte (vgl. Abb. 3-6). Zusammengefasst führte TG zu einem starken Anstieg der diastolischen Ca-Spiegel und einer Beeinträchtigung der Abfallszeit der CaT in beiden Kompartimenten.

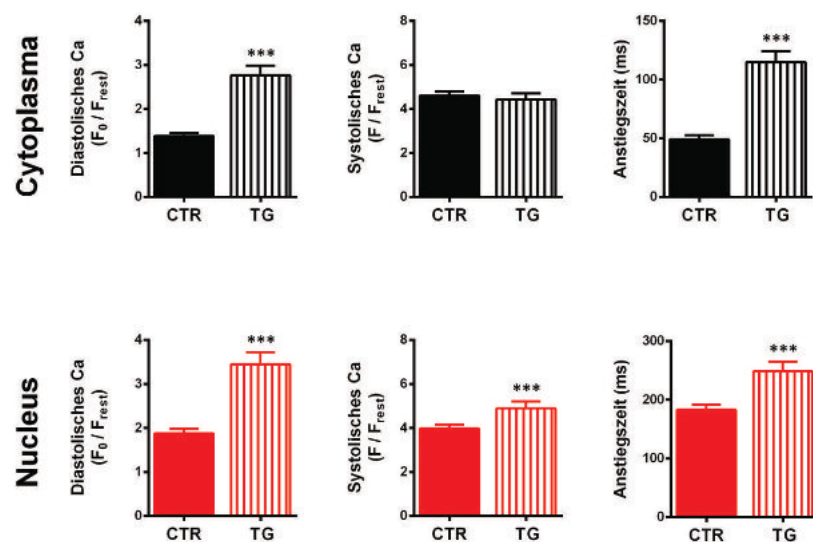


Abbildung 3-8 Charakterisierung des Thapsigargineffekts

Vergleich der Mittelwerte der cyto- und nucleoplasmatischen CaT-Parameter vor (CTR) und nach Gabe von Thapsigargin (TG, 5  $\mu\text{M}$ ). \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n/N = 39/13$ .

### 3.1.4 Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Kalzium

Die Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Ca beinhaltet wertvolle Informationen über die Regulation des nucleären Ca. Um sie zu analysieren, dient eine graphische Auftragung, welche das nucleoplasmatische Ca als Funktion des cytoplasmatischen Ca zeigt (Kern-Cyto-Diagramm) und die für das diastolische und systolische Ca erstellt werden kann.

#### 3.1.4.1 Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Ca in der Diastole

Die Abb. 3-9 zeigt die Kern-Cyto-Diagramme für das diastolische Ca und wurde aus den Ergebnissen der oben beschriebenen Experimente erstellt. In der Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte sich eine starke, positive Korrelation zwischen dem diastolischen Ca im Cytoplasma und im Nucleus bei allen untersuchten Gruppen. Sowohl die Datenpunkte unter Kontrollbedingungen (CTR, grau) als auch die unter Experimentalbedingungen (Ca 0,3 = rot, ISO = blau, TG = grün) beschreiben lineare Funktionen in allen drei Versuchsreihen mit ähnlichen Steigungen zwischen  $\sim 1,1$  und  $1,3$ . Bei  $0,3 \text{ mM Ca}$  (Abb. 3-9A) war eine Parallelverschiebung der Geraden in y-Richtung zu beobachten. Dies lässt sich auf die selektive Verminderung des nucleoplasmatischen diastolischen Ca bei  $0,3 \text{ mM Ca}$  (vgl. Abb. 3-2) zurückführen. Beim Vergleich der Steigungen ergab sich kein signifikanter Unterschied (Ca 0,3:  $1,112$  vs. CTR:  $1,190$ ;  $P=0,825$ ). Nach der Stimulation mit ISO war zwar das mittlere diastolische Ca ebenfalls verringert, die Verteilung der Werte des diastolischen Ca im Kern-Cyto-Diagramm war hingegen nicht verändert (Abb. 3-9B). Auch die Steigungen der beiden Geraden unterschieden sich nicht signifikant (ISO:  $1,072$  vs. CTR:  $1,132$ ;  $P=0,753$ ). Durch die TG-Behandlung wurden dem Diagramm hohe diastolische Werte hinzugefügt (Abb. 3-9C). Dadurch wurde ein weiterer Bereich an diastolischen Ca-Konzentrationen abgebildet, der eine lineare Regressionsgerade mit ähnlicher Steigung wie unter Kontrollbedingungen (TG:  $1,192$  vs. CTR:  $1,292$ ;  $P=0,523$ ) hervorbrachte.



Zusammengenommen deuten die Kern-Cyto-Diagramme darauf hin, dass das diastolische nucleoplasmatische Ca in allen drei experimentellen Serien dem diastolischen cytoplasmatischen Ca folgt.

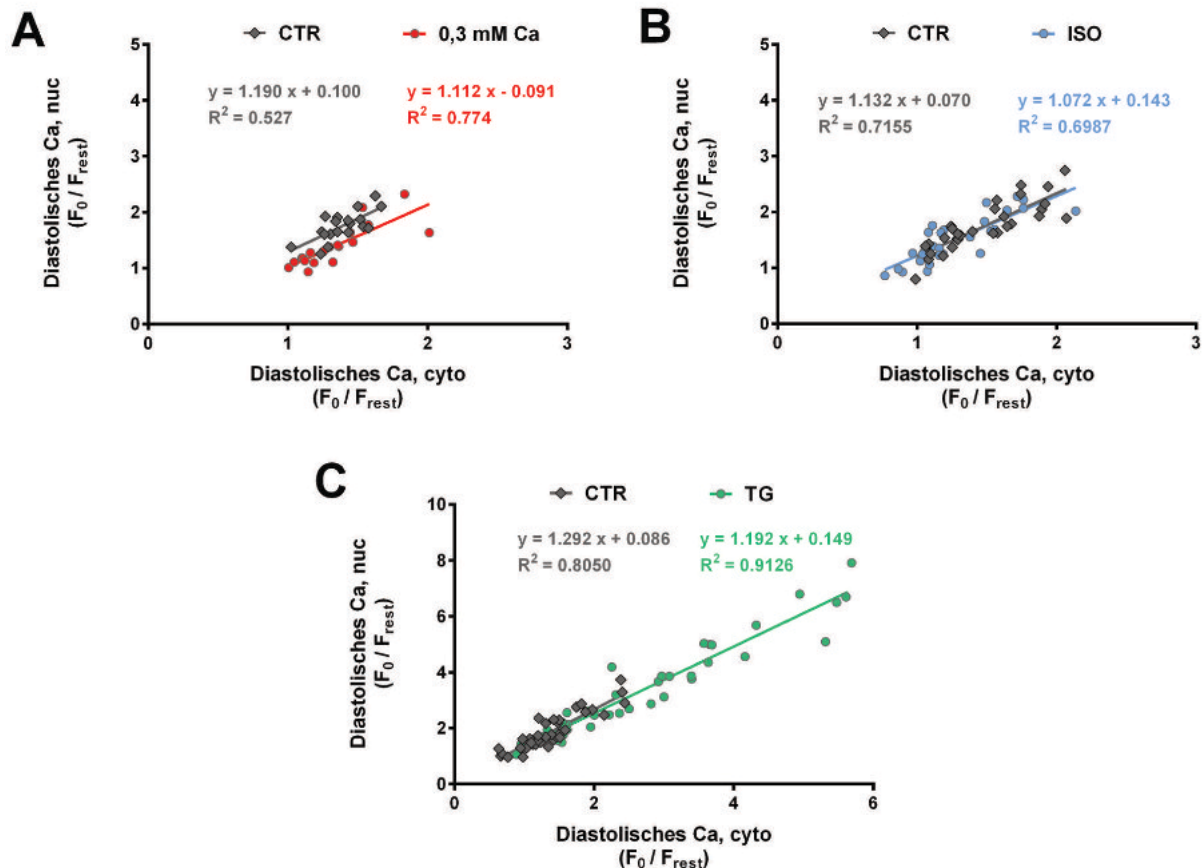
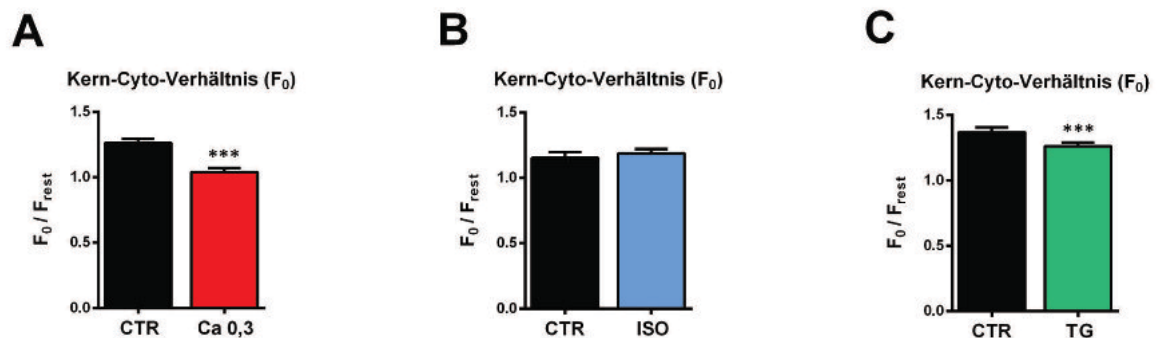


Abbildung 3-9 Kern-Cyto-Diagramme des diastolischen Ca

Auftragung des nucleären diastolischen Ca als Funktion des cytoplasmatischen diastolischen Ca. Aus der Korrelationsanalyse nach Spearman ergaben sich starke, positive Korrelationen für alle Gruppen mit Korrelationskoeffizienten  $r$  von (A) 0,672 (CTR zu 0,3 mM Ca, grau) und 0,853 (0,3 Ca, rot), (B) 0,867 (CTR zu ISO, grau) und 0,824 (ISO, blau), sowie (C) 0,889 (CTR zu TG, grau) und 0,956 (TG, grün); alle  $P < 0,01$ . Für die Werte der unterschiedlichen Gruppen (rot = Ca 0,3; blau = ISO; grün = TG; grau = CTR) wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt und die resultierenden Regressionsgeraden graphisch dargestellt. Die Geradengleichungen sind in den entsprechenden Diagrammen angegeben. Ca 0,3:  $n/N = 19/7$ , ISO:  $n/N = 30/7$ , TG:  $n/N = 39/13$ .

Das Kern-Cyto-Verhältnis (N/C) stellt das Verhältnis von nucleoplasmatischem zu cytoplasmatischem Ca dar. Es wurde als  $F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$  sowohl für das systolische als auch das diastolische Ca berechnet. Abb. 3-10 zeigt den Mittelwertvergleich der Kern-Cyto-Verhältnisse für das diastolische Ca. Das diastolische Ca ist typischerweise im Zellkern höher als im Cytoplasma, was zu einem  $N/C > 1$  führt. Bei 0,3 mM Ca (Abb. 3-10A) war eine signifikante Verringerung des diastolischen N/C um 18% (von  $1,26 \pm 0,03$  auf  $1,04 \pm 0,03$   $F_{0,\text{nuc}}/F_{0,\text{cyto}}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 19/7$ ) zu beobachten. Nach der TG-Exposition (Abb. 3-10C) ließ sich ein ähnlicher Effekt feststellen; hier wurde das diastolische N/C um 8% vermindert (von  $1,37 \pm 0,04$  auf  $1,26 \pm 0,03$   $F_{0,\text{nuc}}/F_{0,\text{cyto}}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 39/13$ ). Die Stimulation mit ISO (Abb. 3-10B) brachte hingegen keine signifikante Änderung des diastolischen N/C hervor (von  $1,15 \pm 0,05$  auf  $1,19 \pm 0,03$   $F_{0,\text{nuc}}/F_{0,\text{cyto}}$ ,  $P = 0,474$ ;  $n/N = 30/7$ ).



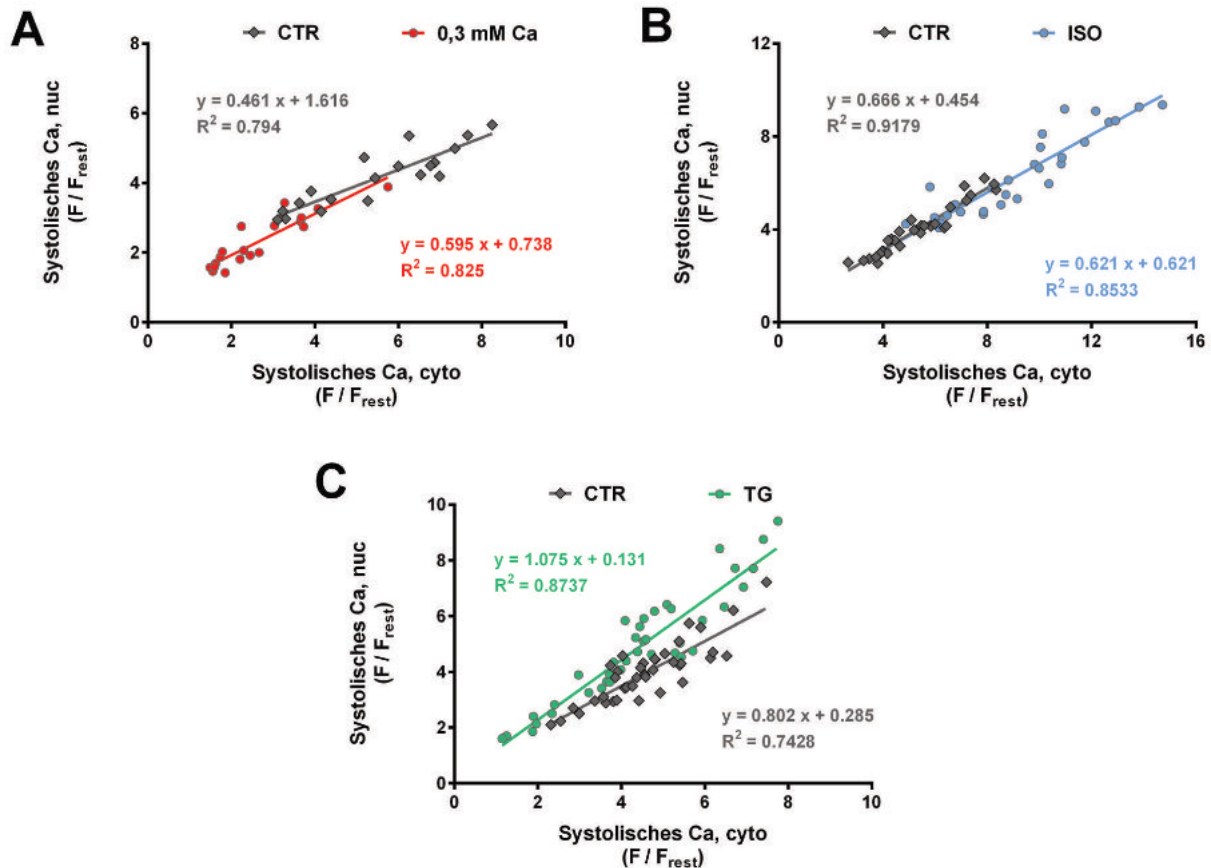
**Abbildung 3-10 Kern-Cyto-Verhältnisse des diastolischen Ca**

Vergleich der Mittelwerte der diastolischen Kern-Cyto-Verhältnisse (N/C). Signifikant verringerte diastolische N/C fanden sich bei (A) 0,3 mM Ca (rot) und nach (C) TG-Applikation (grün), während die (B) Stimulation mit ISO (blau) keine signifikanten Änderungen zeigte. \*\*\*  $P < 0,001$ ; Ca 0,3:  $n/N = 19/7$ , ISO:  $n/N = 30/7$ , TG:  $n/N = 39/13$ .

### 3.1.4.2 Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Ca in der Systole

In Abb. 3-11 sind die Kern-Cyto-Diagramme für das systolische Ca dargestellt. Ähnlich wie bei den Befunden für das diastolische Ca ergab die Korrelationsanalyse nach Spearman eine starke, positive Korrelation für alle untersuchten Gruppen zwischen dem systolischen Ca im Cytosol und im Zellkern. Die Datenpunkte der Kontrollgruppen (CTR, grau) wie auch die der drei experimentellen Interventionen (Ca 0,3 = rot, ISO = blau, TG = grün) ließen sich gut durch lineare Funktionen beschreiben. Bei 0,3 mM Ca (Abb. 3-11A) zeigte sich eine Verschiebung der Datenpunkte zu niedrigeren cyto- und nucleoplasmatischen Werten. Diese Experimentalserie brachte eine Reihe von Werten in einem Bereich von sehr niedrigen Ca-Konzentrationen hervor. Die Steigung bei 0,3 mM Ca unterschied sich nicht signifikant von der Kontrolle (Ca 0,3: 0,595 vs. CTR: 0,461;  $P=0,148$ ). Durch die ISO-Versuchsreihe (Abb. 3-11B) konnte der Wertebereich um sehr hohe Ca-Konzentrationen erweitert werden, wobei noch immer eine lineare Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Ca bei einer vergleichbaren Steigung zur Kontrolle vorlag (ISO: 0,621 vs. CTR: 0,666;  $P=0,558$ ).

Für die TG-Daten (Abb. 3-11C) ergab sich ebenfalls eine lineare Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Ca. In diesem Fall war die Steigung jedoch signifikant steiler (TG: 1,075 vs. CTR: 0,802;  $P<0,05$ ), was auf eine Verschiebung hin zu höheren nucleoplasmatischen Ca-Werten bei einer gegebenen systolischen cytoplasmatischen Ca-Konzentration hindeutet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für das diastolische Ca deuten die systolischen Kern-Cyto-Diagramme insgesamt darauf hin, dass eine lineare Abhängigkeit des systolischen nucleoplasmatischen Ca vom systolischen cytoplasmatischen Ca vorliegt, die für einen weiten Bereich von Ca-Konzentrationen gültig ist.

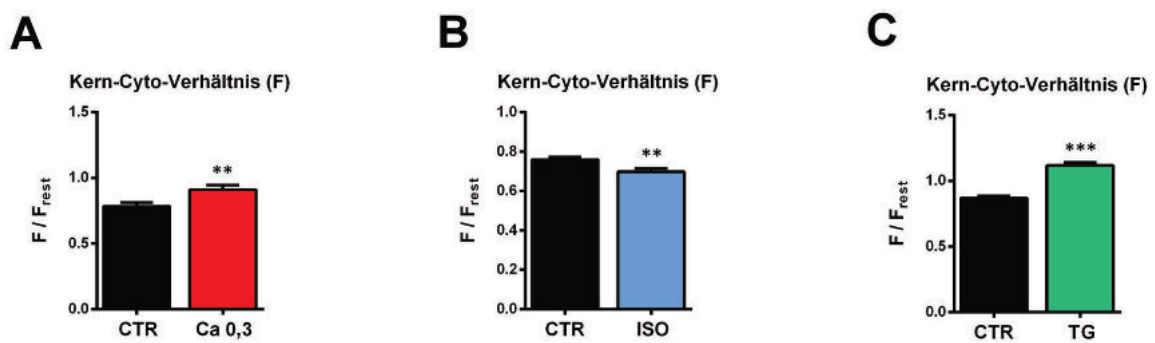


**Abbildung 3-11 Kern-Cyto-Diagramme des systolischen Ca**

Auftragung des nucleären systolischen Ca als Funktion des cytoplasmatischen systolischen Ca. Aus der Korrelationsanalyse nach Spearman ergaben sich starke, positive Korrelationen für alle Gruppen mit Korrelationskoeffizienten  $r$  von (A) 0,867 (CTR zu 0,3 mM Ca, grau) und 0,874 (0,3 Ca, rot), (B) 0,956 (CTR zu ISO, grau) und 0,931 (ISO, blau), sowie (C) 0,830 (CTR zu TG, grau) und 0,913 (TG, grün); alle  $P < 0,01$ . Für die Werte der unterschiedlichen Gruppen (rot = Ca 0,3; blau = ISO; grün = TG; grau = CTR) wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt und die resultierenden Regressionsgeraden graphisch dargestellt. Die Geradengleichungen sind in den entsprechenden Diagrammen angegeben. Ca 0,3:  $n/N = 19/7$ , ISO:  $n/N = 30/7$ , TG:  $n/N = 39/13$ .

Das systolische Kern-Cyto-Verhältnis dient als Indikator für den Anteil des cytoplasmatischen Ca, der während jeder Kontraktion vom Cytoplasma in den Kern übertragen wird. In Abb. 3-12 werden die mittleren Kern-Cyto-Verhältnisse der unterschiedlichen Versuchsserien miteinander verglichen. In den Experimenten

variierte das systolische N/C unter Kontrollbedingungen in einem Bereich von 0,70 bis 0,85. Bei 0,3 mM Ca (Abb. 3-12A) zeigte sich für das systolische N/C eine signifikante Erhöhung um 17% (von  $0,78 \pm 0,03$  auf  $0,91 \pm 0,04$   $F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$ ,  $P < 0,01$ ;  $n/N = 19/7$ ). Ähnlich verhielt es sich bei der TG-Exposition (Abb. 4-12C), wo ein Anstieg um 29% (von  $0,87 \pm 0,02$  auf  $1,12 \pm 0,03$   $F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 39/13$ ) zu beobachten war. Die ISO-Stimulation (Abb. 4-12B) führte hingegen zu einer Verkleinerung des systolischen N/C um 9% (von  $0,76 \pm 0,01$  auf  $0,70 \pm 0,02$   $F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$ ,  $P < 0,01$ ;  $n/N = 30/7$ ). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei 0,3 mM Ca und während der TG-Behandlung die Ausbreitung von systolischem Ca aus dem Cytoplasma in den Zellkern erleichtert war, während sie in Gegenwart von ISO erschwert schien.



**Abbildung 3-12 Kern-Cyto-Verhältnisse des systolischen Ca**

Vergleich der Mittelwerte der systolischen Kern-Cyto-Verhältnisse (N/C). Signifikant erhöhte systolische N/C fanden sich bei (A) 0,3 mM Ca (rot) und nach (C) TG-Applikation (grün), während die (B) Stimulation mit ISO (blau) das systolische N/C signifikant verringerte. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; Ca 0,3:  $n/N = 19/7$ , ISO:  $n/N = 30/7$ , TG:  $n/N = 39/13$ .

### 3.1.4.3 Einfluss der SERCA-Aktivität auf das Kern-Cyto-Verhältnis

Die gegensätzlichen Effekte der drei experimentellen Interventionen auf das N/C könnten durch einen einzigen Mechanismus erklärt werden, der entweder (bei 0,3 mM Ca und während der TG-Exposition) gehemmt oder (mit ISO) stimuliert wird. So ließ sich die Hypothese aufstellen, dass die SERCA-Aktivität diesen Mechanismus darstellt. Dies wird durch den Befund unterstützt, dass TG als spezifischer irreversibler Inhibitor der SERCA den stärksten Effekt auf das N/C zeigte.

Die SERCA-Pumpe ist in Kardiomyozyten für die Entfernung von cytosolischem Ca während der Diastole verantwortlich und macht in Ratten-Ventrikelfibrozyten einen Anteil von ~92% am Abfall der CaT aus (Bers, 2002). In unseren Experimenten wird die Abfallskinetik der CaT durch die Abfallszeitkonstante  $\tau$  charakterisiert, die sich somit als Indikator für die SERCA-Aktivität verwenden lässt. Es wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass die Abfallskinetik des cytosolischen CaT während der SERCA-Inhibition durch TG verlangsamt wird (Kockskämper et al., 2001). Dies zeigte sich auch in unseren Experimenten (Abb. 3-6).

Zur weiteren Überprüfung unserer Hypothese wurde das N/C als Funktion von  $\tau$  aufgetragen (Abb. 3-13). Beim diastolischen Ca im Cytoplasma (Abb. 3-13, oben links) korrelierte ein höherer  $\tau$ -Wert bei 0,3 mM Ca (rot) mit einer Verringerung des N/C, während ein niedrigerer  $\tau$ -Wert unter ISO-Stimulation (blau) das N/C nicht veränderte. Die gleiche Beziehung zwischen dem N/C und  $\tau$  wurde im Zellkern gefunden (Abb. 3-13, unten links). Beim systolischen Ca (Abb. 3-13, oben rechts) ließen sich größere  $\tau$ -Werte bei 0,3 mM Ca verzeichnen, welche mit einem erhöhten N/C einhergingen. Durch ISO wurden die  $\tau$ -Werte kleiner, was mit einer Verminderung des N/C korrelierte. Auch hier wurde die gleiche Beziehung zwischen dem N/C und  $\tau$  im Zellkern gefunden (Abb. 3-13, unten rechts).

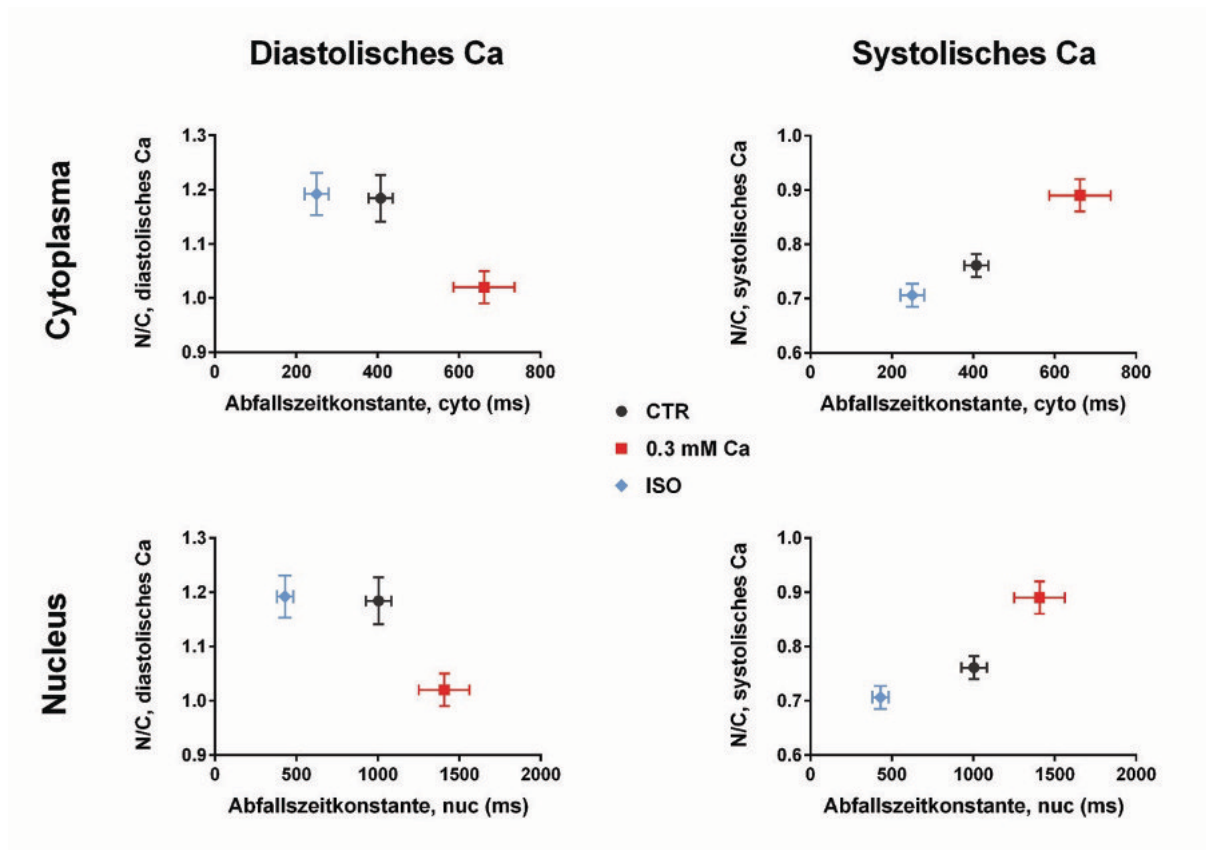


Abbildung 3-13 Zusammenhang zwischen der Abfallszeitkonstante ( $\tau$ ) und dem Kern-Cyto-Verhältnis

Linke Spalte: Diastolisches N/C als Funktion von  $\tau$  für den cytoplasmatischen CaT (oben) und für den nucleoplasmatischen CaT (unten). Das diastolische N/C verringert sich mit steigendem  $\tau$ . Rechte Spalte: Systolisches N/C als Funktion von  $\tau$  für den cytoplasmatischen CaT (oben) und für den nucleoplasmatischen CaT (unten). Das systolische N/C vergrößert sich mit steigendem  $\tau$ . Ca 0,3:  $n/N = 19/7$ , ISO:  $n/N = 30/7$ , TG:  $n/N = 39/13$ .

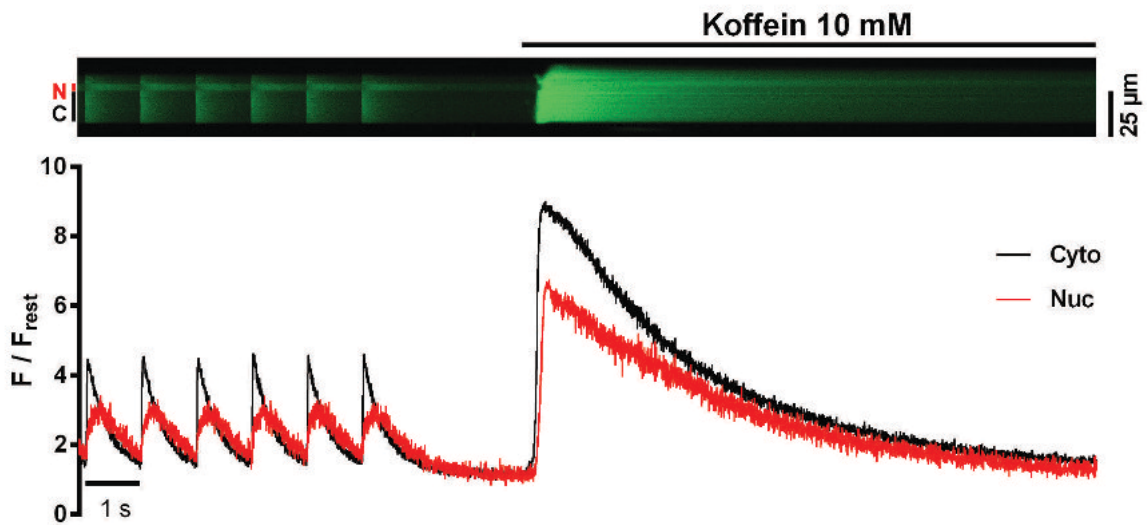
Für das systolische Ca zeigt die Auftragung des N/C als Funktion von  $\tau$  in Abb. 3-13 (rechts) sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus eine nahezu lineare Beziehung. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass die SERCA-Aktivität einen direkten Einfluss auf das N/C hat, wobei eine Erhöhung der SERCA-Aktivität (niedrigeres  $\tau$ ) das N/C verkleinert, während eine Verringerung der Aktivität (höheres  $\tau$ ) das N/C vergrößert.



### 3.1.5 Charakterisierung der intrazellulären Kalziumspeicher

#### 3.1.5.1 Beladung des SR und der perinucleären Kalziumspeicher

Die Funktion der SERCA besteht im aktiven Transport von Ca in das SR und die perinucleären (PN) Ca-Speicher. Deshalb war es in Betracht zu ziehen, dass Änderungen der Ca-Speicherbeladung oder der fraktionellen Ca-Freisetzung aus diesen Speichern im Zusammenhang mit den beschriebenen Effekten auf den nucleären CaT stehen könnten. Die Rolle der Kernhülle als Ca-Speicher- und Freisetzungskompartiment für den nucleoplasmatischen CaT wurde dabei mit Hilfe einer schnellen Koffein-Gabe untersucht, um auf diese Weise das SR und die PN-Speicher zu entleeren. Abb. 3-14 zeigt einen originalen Linescan mit der entsprechenden normalisierten Fluoreszenzintensitätsspur während einer Koffein-Applikation unter Kontrollbedingungen. Hierbei wurde ein ausgewählter Myozyt zunächst bei 1 Hz unter Kontrollbedingungen (1,5 mM Ca) stimuliert und die hervorgerufenen cytoplasmatischen (C, Cyto, schwarz) und nucleoplasmatischen (N, Nuc, rot) CaT aufgezeichnet. Die Stimulation wurde daraufhin gestoppt und es folgte eine schnelle Applikation von Koffein (10 mM), was zur Entleerung der Ca-Speicher und einem damit verbundenen starken Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration führte. Diese schnelle Ca-Freisetzung aus den Speichern erzeugte sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern - ähnlich den elektrisch stimulierten CaT - einen koffeininduzierten CaT ( $\text{CaT}_{\text{koff}}$ ). Dabei führt die Freisetzung des Ca-Inhalts aus dem SR zum cytoplasmatischen  $\text{CaT}_{\text{koff}}$ , während der nucleoplasmatische  $\text{CaT}_{\text{koff}}$  dem Ca-Inhalt der PN-Speicher entspricht.

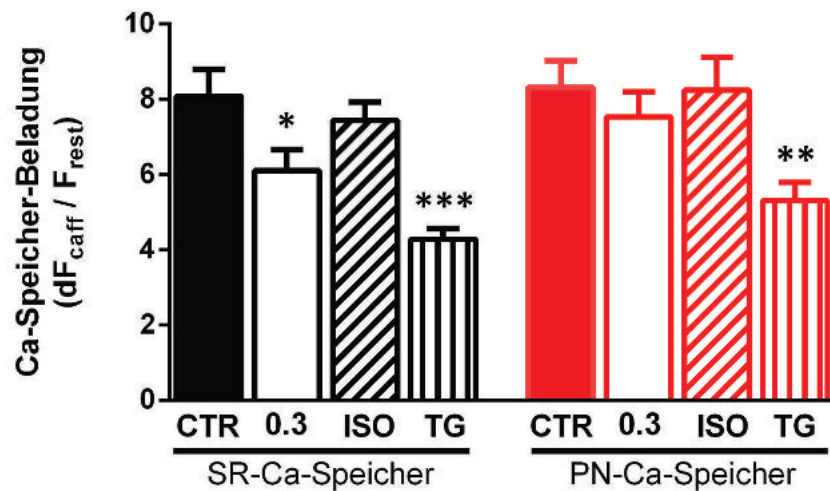


**Abbildung 3-14 Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher durch schnelle Koffeinapplikation**

Repräsentative Original-Linescan-Aufnahme und korrespondierende normalisierte Fluoreszenzintensitätsspuren von elektrisch stimulierten cytoplasmatischen (C, Cyto, schwarz) und nucleoplasmatischen (N, Nuc, rot) CaT gefolgt von einem Stimulationsstopp mit anschließender schneller Applikation von Koffein (10 mM) und daraus resultierendem koffein-induzierten CaT.

Bei der Auswertung der Ca-Beladung des SR und der perinucleären Speicher wurde die Amplitude des auf die Ruhefluoreszenz normierten  $\text{CaT}_{\text{koff}}$  ( $dF_{\text{koff}}/F_{\text{rest}}$ ) im Cytoplasma und im Zellkern bestimmt. Ein Vergleich in Abb. 3-15 zeigt die SR-Ca-Beladung (schwarz) und die PN-Ca-Beladung (rot) unter den verschiedenen Versuchsbedingungen. Bei 0,3 mM Ca verringerte sich die SR-Ca-Beladung um 25% (von CTR  $8,08 \pm 0,72$  auf  $6,10 \pm 0,57$   $dF_{\text{koff}}/F_{\text{rest}}$  bei Ca 0,3;  $P < 0,05$ ; CTR:  $n/N = 9/6$ , Ca 0,3:  $n/N = 9/5$ ) im Vergleich zur CTR, während keine Änderung der PN-Ca-Beladung zu beobachten war. Die ISO-Gabe änderte die SR-Ca-Beladung nicht, was mit den Befunden in früheren Studien übereinstimmt (Karpinski & Györke, 2001), und hatte auch keinen Einfluss auf die PN-Ca-Beladung. Nach der TG-Applikation verringerte sich die SR-Ca-Beladung um 30% (auf  $4,27 \pm 0,29$   $dF_{\text{koff}}/F_{\text{rest}}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 8/2$ ) und die PN-Ca-Beladung um 29% (von CTR  $7,53 \pm 0,67$  auf  $5,31 \pm 0,48$   $dF_{\text{koff}}/F_{\text{rest}}$  unter TG,  $P < 0,01$ ; CTR:  $n/N = 9/6$ , TG:  $n/N = 8/2$ ). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass bei

0,3 mM Ca und nach TG-Behandlung die SR-Ca-Beladung vermindert war, was sich auf eine Verringerung der SERCA-Aktivität zurückführen lässt, die mit einem Nettoverlust von Ca aus dem SR einhergeht. Die PN-Ca-Beladung hingegen wurde nur von TG reduziert. Dem gegenüber konnte nach der ISO-Stimulation weder eine Änderung der SR- noch der PN-Ca Beladung beobachtet werden.

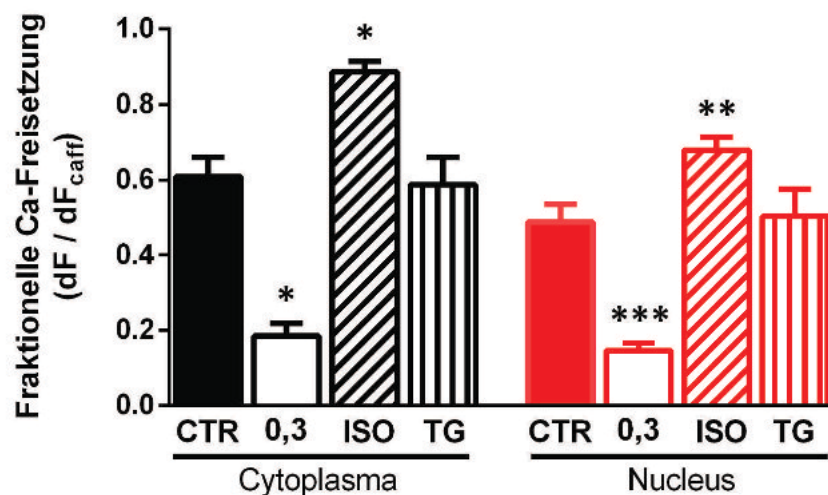


**Abbildung 3-15 Charakterisierung der SR- und PN-Ca-Speicherbeladung**

Mittelwerte der aus der koffein-induzierten Ca-Freisetzung errechneten Ca-Speicherbeladungen. Es zeigen sich signifikant verringerte SR-Ca-Beladungen (schwarz) unter 0,3 mM Ca und nach Behandlung mit TG, während die PN-Ca-Beladung (rot) nur unter TG vermindert war. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. CTR; Ca 0,3:  $n/N = 9/5$ , ISO:  $n/N = 13/4$ , TG:  $n/N = 8/2$ , CTR:  $n/N = 9/6$ .

### 3.1.5.2 Fraktionelle Ca-Freisetzung aus dem SR und den perinucleären Kalziumspeichern

Bei der fraktionellen Ca-Freisetzung (*fractional release*, FR) handelt es sich um den während einer Kontraktion freigesetzten Anteil von Ca in Relation zum Gesamtinhalt des betrachteten Ca-Speichers. Sie ergibt sich rechnerisch aus dem Verhältnis der Amplitude des elektrisch evozierten CaT zur Amplitude des CaT<sub>koff</sub> ( $dF/dF_{koff}$ ). Die FR beträgt unter Kontrollbedingungen (CTR) ~0,6 im Cytoplasma und ~0,5 im Zellkern (Abb. 3-16) und ähnelte damit den in der Literatur beschriebenen Werten (Kockskämper et al., 2008b; Plackic et al., 2016).



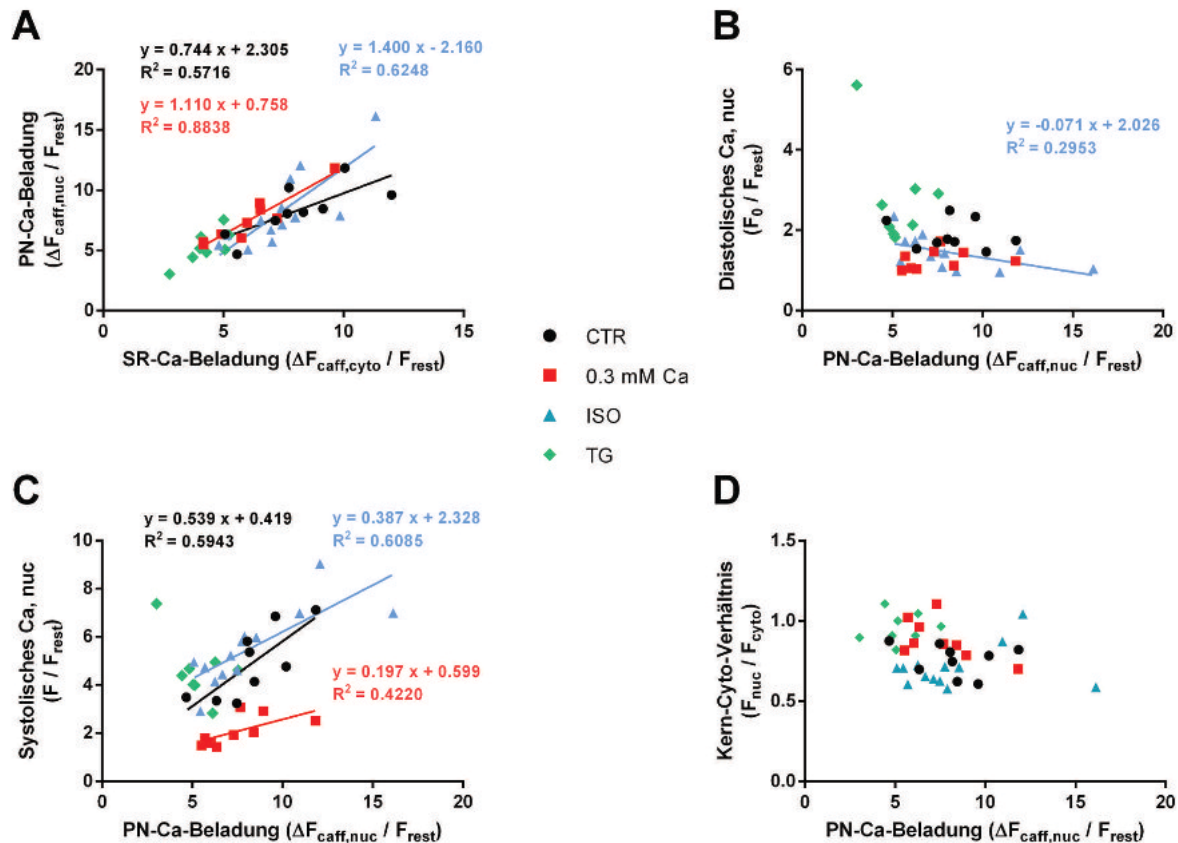
**Abbildung 3-16** Charakterisierung der fraktionellen Ca-Freisetzung aus SR- und PN-Ca-Speichern

Der Vergleich der Mittelwerte der fraktionellen Ca-Freisetzung (FR) zeigt für beide Kompartimente eine Verminderung unter 0,3 mM Ca und eine Vergrößerung nach der Stimulation mit ISO, während TG keinen Einfluss auf die FR hat. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. CTR; Ca 0,3:  $n/N = 9/5$ , ISO:  $n/N = 13/4$ , TG:  $n/N = 8/2$ , CTR:  $n/N = 9/6$ .

Unter 0,3 mM Ca zeigte sich eine beträchtliche Verringerung der FR um 69% im Cytoplasma (von CTR  $0,61 \pm 0,05$  auf  $0,19 \pm 0,03$  dF/dF<sub>koff</sub> bei Ca 0,3;  $P < 0,05$ ; CTR:  $n/N = 9/6$ , Ca 0,3:  $n/N = 9/5$ ) und um 69% im Nucleus (von CTR  $0,49 \pm 0,05$  auf  $0,15 \pm 0,02$  dF/dF<sub>koff</sub> bei Ca 0,3;  $P < 0,001$ ; CTR:  $n/N = 9/6$ , Ca 0,3:  $n/N = 9/5$ ). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit ISO zu einer Vergrößerung der FR um 51% im Cytoplasma (auf  $0,89 \pm 0,03$  dF/dF<sub>koff</sub>,  $P < 0,05$ ;  $n/N = 13/4$ ) und um 39% im Nucleoplasma (auf  $0,68 \pm 0,03$  dF/dF<sub>koff</sub>,  $P < 0,01$ ;  $n/N = 13/4$ ). Unter TG ließen sich hingegen gar keine Änderungen der FR beobachten (FR<sub>Cyto</sub> von CTR  $0,61 \pm 0,05$  auf  $0,58 \pm 0,07$  dF/dF<sub>koff</sub> unter TG,  $P = \text{ns}$  und FR<sub>nuc</sub> von CTR  $0,49 \pm 0,05$  auf  $0,50 \pm 0,29$  dF/dF<sub>koff</sub> unter TG,  $P = \text{ns}$ ; CTR:  $n/N = 9/6$ , TG:  $n/N = 8/2$ ).

### 3.1.5.3 Die Rolle der perinucleären Kalziumspeicher für die Kernkalziumregulation

Es musste ein möglicher Zusammenhang zwischen der perinucleären Ca-Beladung und der SR-Ca-Beladung in Betracht gezogen werden. Zur Untersuchung dieser Frage wurde die PN-Ca-Beladung in Abhängigkeit von der SR-Ca-Beladung (Abb. 3-17A) aufgetragen. Dargestellt sind die Einzelwerte der vier experimentellen Gruppen (Ca 0,3, ISO, TG, CTR). Es ergab sich eine starke positive Korrelation zwischen der SR-Ca-Beladung und der PN-Ca-Beladung für alle Gruppen, mit Ausnahme der TG-Gruppe ( $P = 0,069$ ). Das Verteilungsmuster der Werte deutete auf eine lineare Beziehung zwischen PN-Ca-Beladung und SR-Ca-Beladung hin und ließ sich durch Regressionsgeraden mit Steigungen zwischen 0,74 und 1,40 beschreiben. Die gezeigte Abhängigkeit der PN-Ca-Beladung von der SR-Ca-Beladung legt nahe, dass das SR und die PN-Ca-Speicher einen hohen Verbindungsgrad aufweisen und funktionell als ein einziges Kompartiment zu betrachten sind, was bereits früher berichtet wurde (Wu & Bers, 2006a).



**Abbildung 3-17 Die Rolle der PN-Ca-Speicherbeladung für die nucleäre Ca-Regulation**

(A) PN-Ca-Beladung als Funktion der SR-Ca-Beladung. Aus der Korrelationsanalyse nach Spearman ergaben sich positive Korrelationen für die Gruppen CTR, 0.3 Ca und ISO mit Korrelationskoeffizienten  $r$  von 0,850 (CTR, schwarz), 0,900 (0,3 Ca, rot) und 0,841 (ISO, blau); alle  $P < 0,01$ . Die Korrelation für TG war nicht signifikant ( $P = 0,069$ ). Für die Werte der unterschiedlichen Gruppen mit positiver Korrelation (schwarz = CTR; rot = Ca 0,3; blau = ISO) wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt und die resultierenden Regressionsgeraden graphisch dargestellt. (B) Diastolisches  $\text{Ca}_{\text{nuc}}$  als Funktion der PN-Ca-Beladung. Das diastolische  $\text{Ca}_{\text{nuc}}$  korreliert nicht mit der PN-Ca-Beladung (mit Ausnahme von ISO;  $r = -0,632$ ,  $P < 0,05$ ). (C) Systolisches  $\text{Ca}_{\text{nuc}}$  als Funktion der PN-Ca-Beladung. Es zeigte sich eine starke, positive Korrelation für die Gruppen CTR, 0.3 Ca und ISO mit Korrelationskoeffizienten  $r$  von 0,733 (CTR, schwarz,  $P < 0,05$ ), 0,767 (0,3 Ca, rot,  $P < 0,05$ ) und 0,857 (ISO, blau,  $P < 0,001$ ). Für die Gruppen mit positiver Korrelation (schwarz = CTR; rot = Ca 0,3; blau = ISO) wurden Regressionsanalysen durchgeführt und die Geraden abgebildet. (D) Systolisches Kern-Cyto-Verhältnis als Funktion der PN-Ca-Beladung. Es wurde keine Korrelation zwischen PN-Ca-Beladung und systolischem N/C gefunden ( $P = \text{ns}$  in allen Gruppen). Ca 0,3:  $n/N = 9/5$ , ISO:  $n/N = 13/4$ , TG:  $n/N = 8/2$ , CTR:  $n/N = 9/6$ .

Um die Rolle der PN-Ca-Beladung für den elektrisch stimulierten CaT weiter zu beleuchten, wurde das diastolische und systolische nucleäre Ca als Funktion der PN-Ca-Beladung aufgetragen, wie in Abb. 3-17B bzw. 3-17C dargestellt. Das diastolische Ca schien dabei nicht von der PN-Ca-Beladung abhängig zu sein (Abb. 3-17B), was sich darin zeigte, dass sich keine Korrelationen der beiden Parameter in der Kontrollgruppe sowie unter 0,3 mM Ca und TG finden ließen. Lediglich die ISO-Gruppe wies eine inverse Korrelation zwischen diastolischem Ca und PN-Ca-Beladung auf, die bei der linearen Regression eine flache, negative Steigung von -0,071 ergab.

Eine starke, positive Korrelation bei der CTR ( $P < 0,05$ ), 0,3 Ca ( $P < 0,05$ ) und der ISO-Gruppe ( $P < 0,001$ ) zeigte sich hingegen für das systolische Ca und die PN-Ca-Beladung (Abb. 3-17C). Die Steigungen lagen dabei zwischen 0,197 und 0,539. Nur in der TG-Gruppe korrelierte das systolische Ca nicht mit der PN-Ca-Beladung ( $P = 0,54$ ).

Letztlich wurde eine Abhängigkeit zwischen dem systolischen Kern-Cyto-Verhältnis (N/C) und der PN-Ca-Beladung untersucht. Hierbei ergab sich keine Korrelation zwischen den beiden Parametern (3-17D), was darauf hindeutet, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der PN-Ca-Beladung und der systolische Ca-Propagation in den Zellkern besteht.

## 3.2 Studien am Krankheitsmodell

Für diese Versuche wurden Ventrikelfibrozyten von 12-18 Wochen alten SHR-Ratten verwendet. Ziele der Studien am pathologischen Modell waren die (1) Überprüfung, ob die aus den Versuchen am physiologischen Modell gewonnen Erkenntnisse auf ein anderes Tiermodell übertragbar waren, sowie der (2) Vergleich der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Tiermodellen unter Berücksichtigung eines möglichen Einflusses der spezifischen Pathologie der SHR-Ratten.



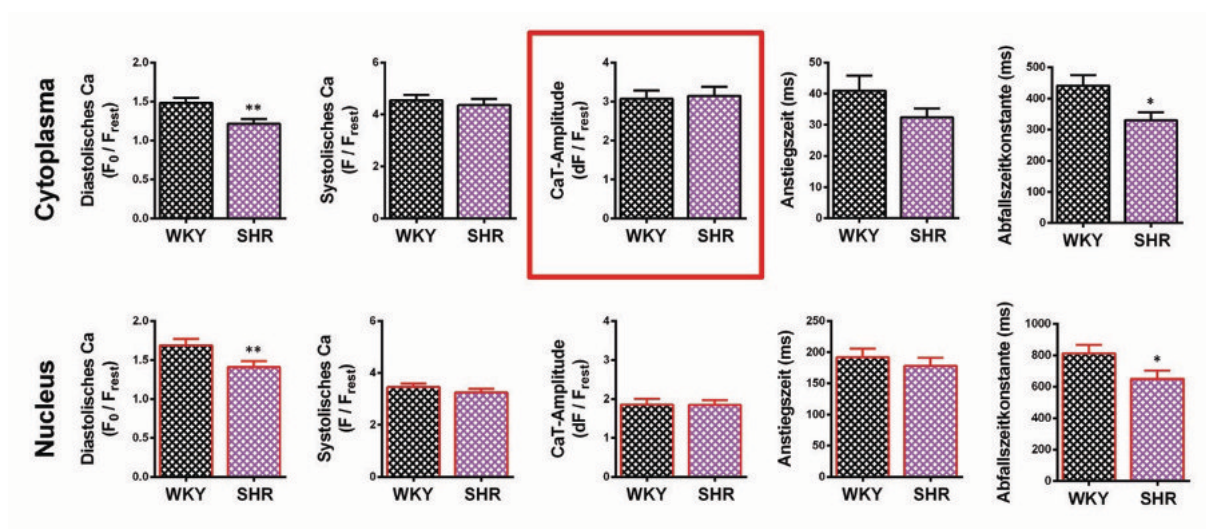
### 3.2.1 Auswahl der Zellen

In früheren Studien an ventrikulären Kardiomyozyten von SHR-Ratten zeigten sich im Vergleich zu den Kontrollen (WKY oder Wistar) Unterschiede in der cytosolischen Ca-Regulation, welche mit größeren cytoplasmatischen CaT einhergingen (Chen-Izu et al., 2007; Fowler et al., 2005; Plackic et al., 2016; Shorofsky et al., 1999). Da ein Kernaspekt der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Rolle des cytoplasmatischen CaT als Einflussfaktor auf den nucleären CaT darstellt und in diesem Zusammenhang der Vergleich zwischen WKY- und SHR-Ratten interessant war, wurde ein Verfahren zur Schaffung von annähernd gleichen Ausgangsbedingungen konzipiert.

Ziel war es, Zellen aus beiden Gruppen (WKY und SHR) miteinander zu vergleichen, die unter basalen (Kontroll-) Bedingungen annähernd gleich große CaT-Amplituden aufwiesen. Dies wurde auf folgende Weise erreicht: Bei der Begutachtung der zur Messung vorbereiteten, mit Farbstoff beladenen SHR-Zellen wurde darauf geachtet, aus der Bandbreite von unterschiedlich hell fluoreszierenden Zellen möglichst eine Auswahl zu treffen, die sich im Bereich von geringer bis mittlerer Fluoreszenzintensität befand. Stark fluoreszierende Zellen wurden somit bewusst von der Auswahl ausgeschlossen.

Die auf diese Weise ausgewählten SHR-Zellen ( $n/N = 22/4$ ) zeigten nun im Mittel eine kleinere CaT-Amplitude als die WKY-Zellen. Daher wurden diese im Anschluss einem Matching unterzogen. Dabei sollte erreicht werden, dass den 22 SHR-Zellen eine gematchte Gruppe von 22 WKY-Zellen gegenübergestellt wird, deren mittlere auf die Ruhefluoreszenz normierten CaT-Amplituden ( $dF/F_{rest}$ ) sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Dafür wurde die Gruppe von 30 WKY-Zellen auf eine Anzahl von genau 22 Zellen verkleinert, indem die 8 Zellen mit den höchsten  $dF/F_{rest}$ -Werten entfernt wurden. Die daraus resultierenden Gruppen zeigten CaT-Amplituden (Abb. 3-18) von  $3,07 \pm 0,22 \text{ } dF/F_{rest}$  in WKY und  $3,15 \pm 0,23 \text{ } dF/F_{rest}$  in SHR, die sich nicht signifikant unterschieden ( $P=0,805$ ). Beim weiteren Vergleich fiel ein vermindertes diastolisches Ca in den SHR-Zellen sowohl im Cytoplasma ( $1,22 \pm 0,27 \text{ } F_0/F_{rest}$  in SHR vs.  $1,48 \pm 0,31 \text{ } F_0/F_{rest}$  in WKY,  $P < 0,01$ ; SHR:  $n/N = 22/4$ , WKY:  $n/N = 22/7$ ) als auch im Nucleus ( $1,41 \pm 0,08 \text{ } F_0/F_{rest}$  in SHR vs.  $1,69 \pm 0,08 \text{ } F_0/F_{rest}$  in

WKY,  $P < 0,01$ ; SHR:  $n/N = 22/4$ , WKY:  $n/N = 22/7$ ) auf und darüber hinaus eine signifikant verringerte Abfallszeitkonstante in beiden Kompartimenten (Cyto:  $330 \pm 25$  ms in SHR vs.  $441 \pm 35$  ms in WKY,  $P < 0,05$ ; Nuc:  $651 \pm 51$  ms in SHR vs.  $813 \pm 54$  ms in WKY,  $P < 0,05$ ; SHR:  $n/N = 22/4$ , WKY:  $n/N = 22/7$ ). Diese Befunde deuten auf eine basal erhöhte SERCA-Aktivität in SHR hin und sind konform mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen (Chen-Izu et al., 2007; Fowler et al., 2005; Plackic et al., 2016; Shorofsky et al., 1999).



**Abbildung 3-18 Vergleich der CaT von SHR- und WKY-Zellen nach dem Matching der Gruppen**

Vergleich der Mittelwerte der CaT-Parameter nach vorangegangenem Matching der Gruppen mit dem Ziel, ähnliche cytoplasmatische CaT-Amplituden (roter Kasten) als Grundlage für weitere Betrachtungen zu erhalten. Es zeigen sich ein signifikant verringertes diastolisches Ca ( $F_0/F_{rest}$ ) und verkleinerte Abfallszeitkonstanten bei den SHR-Zellen in beiden Kompartimenten.

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; WKY:  $n/N = 22/7$ , SHR:  $n/N = 22/4$ .

### 3.2.2 Modulation des cytoplasmatischen CaT und der SERCA-Aktivität in SHR-Ventrikeldmyozyten durch Isoprenalin

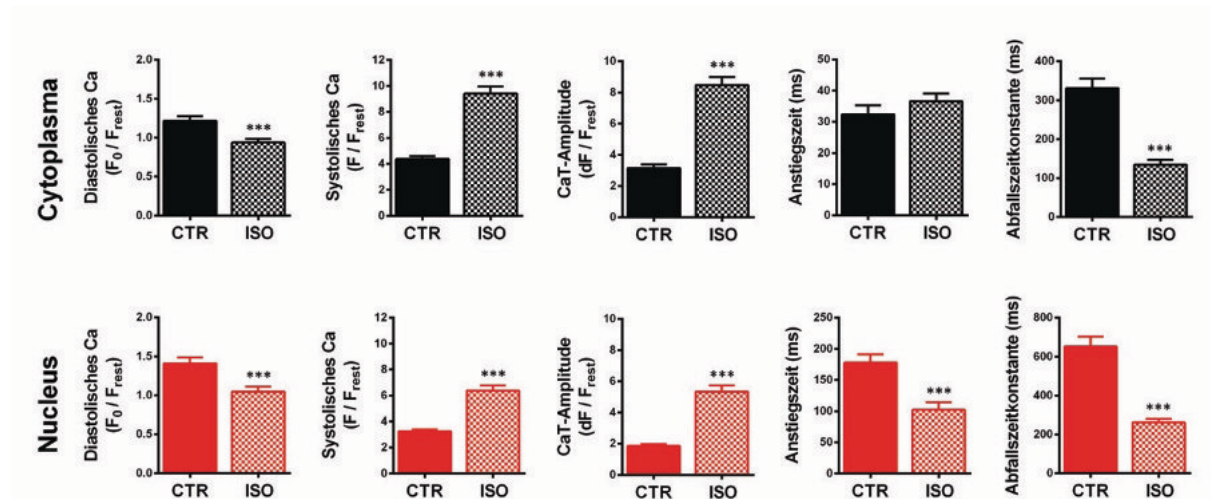
Zur Überprüfung der gewonnenen Erkenntnisse aus den Studien mit WKY-Zellen bedurfte es einer Manipulation des cytoplasmatischen CaT sowie einer Modulation der SERCA-Aktivität in den SHR-Zellen, um so die Effekte auf die nucleäre Ca-Regulation untersuchen zu können. Hierzu wurde erneut Isoprenalin (ISO, 10 nM) verwendet, um so die intrazelluläre Ca-Konzentration in den Kardiomyozyten zu erhöhen und gleichzeitig die SERCA-Aktivität zu steigern.

Die Zellen wurden mit Mess-Tyrode (1,5 mM Ca, Kontrollbedingungen) zur Aufnahme basaler CaT superfundiert, um im Anschluss auf eine ISO-Lösung (10 nM in Mess-Tyrode) zu wechseln. Die ISO-Applikation führte zu einem deutlichen Anstieg des cytoplasmatischen und nucleoplasmatischen systolischen Fluoreszenzsignals, wohingegen das diastolische Signal abnahm. Die Abfallszeit der CaT zeigte sich sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern beschleunigt.

#### 3.2.2.1 Die Erhöhung des cytoplasmatischen CaT vergrößert den nucleären CaT in SHR-Ventrikeldmyozyten

Bei der Betrachtung der gemittelten CaT-Parameter (Abb. 3-19) fällt eine beachtliche Vergrößerung des systolischen cytoplasmatischen Ca ( $Ca_{cyto}$ ) sowie nucleoplasmatischen Ca ( $Ca_{nuc}$ ) nach ISO-Applikation auf. Es zeigte sich ein Anstieg im systolischen  $Ca_{cyto}$  von 116% (von  $4,36 \pm 0,23$  auf  $9,40 \pm 0,54$   $F/F_{rest}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 22/4$ ), während das systolische  $Ca_{nuc}$  um 96% (von  $3,26 \pm 0,14$  auf  $6,39 \pm 0,40$   $F/F_{rest}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 22/4$ ) erhöht wurde. Darüber hinaus wurde eine Verringerung des diastolischen Ca sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern beobachtet (um 30% im Cytoplasma, von  $1,22 \pm 0,06$  auf  $0,94 \pm 0,04$   $F_0/F_{rest}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 22/4$  und um 34% im Nucleus, von  $1,41 \pm 0,08$  auf  $1,05 \pm 0,06$   $F_0/F_{rest}$ ,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 22/4$ ). Durch den

Abfall des diastolischen Ca bei gleichzeitigem Anstieg des systolischen Ca war die Vergrößerung der CaT-Amplituden besonders eindrücklich (um 169% im Cytoplasma, von  $3,15 \pm 0,23$  auf  $8,47 \pm 0,53$  dF/F<sub>rest</sub>,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 22/4$  und um 189% im Nucleus, von  $1,85 \pm 0,12$  auf  $5,35 \pm 0,39$  dF/F<sub>rest</sub>,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 22/4$ ).



**Abbildung 3-19 Charakterisierung des Isoprenalineffekts in SHR-Ventrikeldomyozyten**

Mittelwerte der cyto- und nucleoplasmatischen CaT-Parameter vor (CTR) und nach 5 min Behandlung mit Isoprenalin (10 nM). \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n/N = 22/4$ .

Auch die kinetischen Parameter wiesen unter ISO-Exposition Änderungen auf. Die Anstiegszeit im Nucleus (TTP<sub>nuc</sub>) war signifikant verkürzt (von  $178 \pm 13$  auf  $102 \pm 12$  ms,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 22/4$ ), wohingegen sich die Anstiegszeit im Cytoplasma (TTP<sub>cyto</sub>) nicht signifikant unterschied ( $32 \pm 3$  versus  $37 \pm 10$  ms,  $P = 0,186$ ;  $n/N = 22/4$ ). Sowohl im Cytosol als auch im Zellkern war die Abfallszeit der CaT unter ISO deutlich verkürzt, was mit einer Verringerung der  $\tau$ -Werte um ~60% ( $\tau_{cyto}$ , von  $330 \pm 25$  auf  $134 \pm 13$  ms,  $P < 0,001$ , und  $\tau_{nuc}$ , von  $651 \pm 51$  auf  $261 \pm 19$  ms,  $P < 0,001$ ;  $n/N = 22/4$ ) einherging.

Der Anstieg des systolischen Ca bei gleichzeitigem Abfall des diastolischen Ca und die schnellere Abfallskinetik der cytoplasmatischen CaT als wichtigste ISO-vermittelte Effekte entsprechen in den SHR-Zellen qualitativ den Beobachtungen aus den WKY-

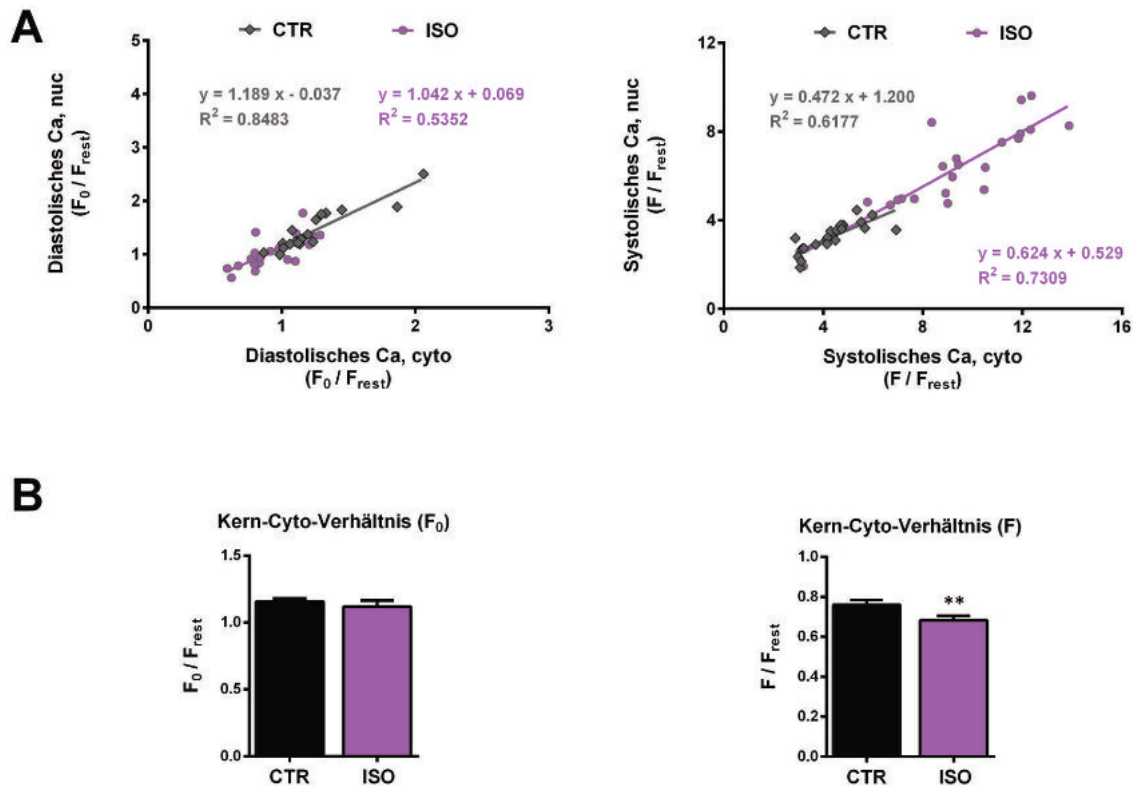
Zellen. Weiterhin folgte der Zellkern den Änderungen des cytoplasmatischen systolischen und diastolischen Ca, sowie der beschleunigten Abfallszeitkinetik. Dies deutet darauf hin, dass die für das nucleäre Ca in WKY-Zellen erhobenen Befunde, auf qualitativer Ebene auch für die SHR-Myozyten gültig sein könnten.

### 3.2.2.2 Das Verhältnis von nucleärem und cytoplasmatischem Ca in SHR-Ventrikelfmyozyten

Als nächstes wurde die Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Ca in SHR-Myozyten ausgewertet. Hierzu diente erneut die Auftragung des Kern-Cyto-Diagrammes sowie die Berechnung des Kern-Cyto-Verhältnisses (N/C) für jeweils diastolisches und systolisches Ca.

Abb. 3-20A (linke Spalte) zeigt das Kern-Cyto-Diagramm für das diastolische Ca. In der Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte sich in beiden Gruppen eine starke, positive Korrelation zwischen dem systolischen Ca im Cytosol und dem im Zellkern. Sowohl die Datenpunkte unter Kontrollbedingungen (CTR, grau) als auch nach ISO-Exposition (ISO, violett) beschrieben lineare Funktionen mit Steigungen, die sich nicht signifikant unterschieden (Ca 0,3: 1,112 vs. CTR: 1,190,  $P=0,825$ ). Nach der Stimulation mit ISO war zwar das mittlere diastolische Ca verringert, die Verteilung der Werte des diastolischen Ca im Kern-Cyto-Diagramm war hingegen nicht verändert. Das Kern-Cyto-Diagramm legt nahe, dass das diastolische nucleoplasmatische Ca auch in SHR-Ventrikelfmyozyten dem diastolischen cytoplasmatischen Ca folgt.

Der Mittelwertvergleich des Kern-Cyto-Verhältnisses für das diastolische Ca ist in Abb. 3-20B (linke Spalte) dargestellt. Die Stimulation mit ISO führte zu keiner signifikanten Änderung des diastolischen N/C (von  $1,16 \pm 0,02$  auf  $1,12 \pm 0,05$   $F_{0,nuc}/F_{0,cyto}$ ,  $P=0,290$ ;  $n/N = 22/4$ ), was den Befunden aus WKY-Zellen entspricht.



**Abbildung 3-20 Nucleoplasmatisches versus cytoplasmatisches Ca in SHR-Ventrikeldomyozyten**

(A) Auftragung des nucleären Ca als Funktion des cytoplasmatischen Ca. Es sind separate Betrachtungen für das diastolische Ca und das systolische Ca dargestellt. Aus der Korrelationsanalyse nach Spearman ergaben sich starke, positive Korrelationen für alle Gruppen mit Korrelationskoeffizienten  $r$  für das diastolische Ca (linke Spalte) von 0,857 (CTR zu ISO, grau) und 0,749 (ISO, violett) sowie für das systolische Ca (rechte Spalte) von 0,876 (CTR zu ISO, grau) und 0,824 (ISO, violett); alle  $P < 0,001$ . Für die Werte der unterschiedlichen Gruppen wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt und die resultierenden Regressionsgeraden graphisch dargestellt. Die Geradengleichungen sind in den entsprechenden Diagrammen angegeben. (B) Vergleich der Mittelwerte des diastolischen (linke Spalte) und systolischen (rechte Spalte) Kern-Cyto-Verhältnisses (N/C). Es zeigte sich ein signifikant verringertes systolisches N/C unter Stimulation mit ISO (violett). \*\*  $P < 0,01$ ;  $n/N = 22/4$ .

Das Kern-Cyto-Diagramm für das systolische Ca zeigt Abb. 3-20A (rechte Spalte). Ähnlich wie bei den Beobachtungen für das diastolische Ca ergab die Korrelationsanalyse nach Spearman in beiden Gruppen eine starke, positive Korrelation zwischen dem systolischen Ca im Cytosol und dem im Zellkern. Die Datenpunkte der



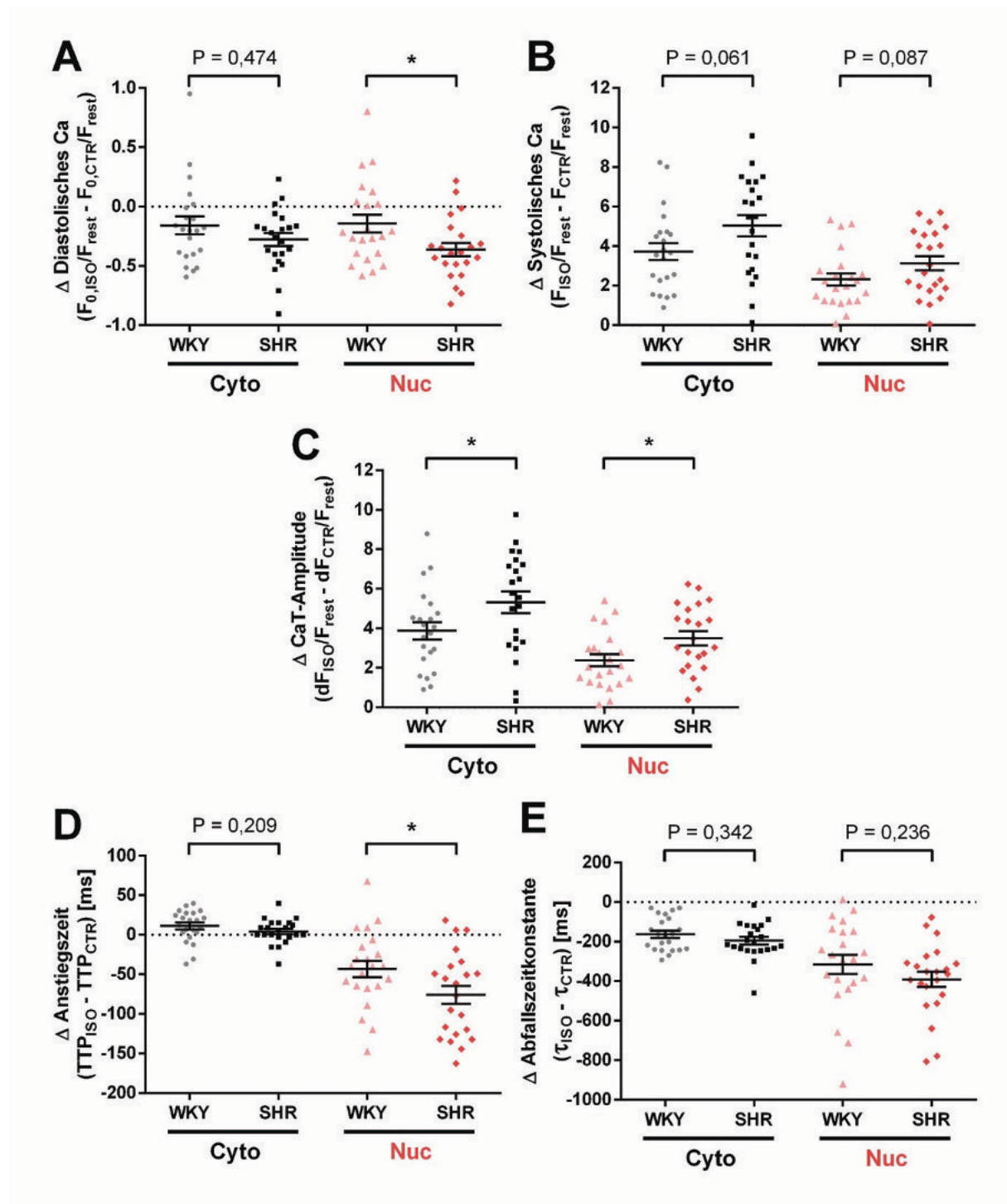
Kontrollgruppe (CTR, grau) wie auch die der ISO-Gruppe (ISO, violett) ließen sich gut durch lineare Funktionen beschreiben. Durch die relativ hohen  $F/F_{\text{rest}}$ -Werte unter ISO-Behandlung konnte der Wertebereich ausgedehnt werden und zeigt insgesamt eine lineare Beziehung zwischen cyto- und nucleoplasmatischem Ca bei einer vergleichbaren Steigung zur CTR-Gruppe (ISO: 0,624 vs. CTR: 0,472;  $P=0,366$ ). Analog zu den Ergebnissen für das diastolische Ca deuten die systolischen Kern-Cyto-Diagramme insgesamt darauf hin, dass auch in SHR-Zellen (wie in WKY-Zellen) eine lineare Abhängigkeit des systolischen nucleoplasmatischen Ca vom systolischen cytoplasmatischen Ca vorliegt, die ebenso für einen weiten Bereich von Ca-Konzentrationen gültig ist.

Beim Vergleich der systolischen Kern-Cyto-Verhältnisse (Abb. 3-20,B, rechte Spalte) zeigte sich eine ISO-vermittelte Verringerung um 12% (von  $0,76 \pm 0,02$  auf  $0,68 \pm 0,02$   $F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$ ,  $P < 0,01$ ;  $n/N = 22/4$ ). Daraus lässt sich ableiten, dass die ISO-Stimulation passend zu den Ergebnissen aus den WKY-Studien auch in den SHR-Zellen zu einer eingeschränkten Ausbreitung des systolischen Ca aus dem Cytoplasma in den Zellkern führt.

### 3.2.3 Unterschiede in der Effektstärke von Isoprenalin zwischen WKY- und SHR-Ventrikelfibrozyten

Zum Vergleich der Stärke des ISO-Effekts zwischen SHR- und WKY-Ventrikelfibrozyten wurden jeweils die Differenzwerte zwischen dem Zeitpunkt vor Beginn der ISO-Applikation ( $t_0$ ) und dem nach 5 min ISO-Exposition ( $t_5$ ) gebildet. Die Einzelwerte der SHR- und WKY-Zellen für Cytoplasma und Zellkern sind im Streudiagramm in Abb. 3-21 dargestellt.





**Abbildung 3-21 Vergleich der Isoprenalineffekte zwischen SHR- und WKY-Ventrikeldmyozyten**  
 Aufgetragen sind die Differenzwerte zwischen  $t_0$  (CTR) und  $t_5$  (5 min ISO-Exposition) der einzelnen Zellen für die cytoplasmatischen (grau = WKY, schwarz = SHR) und nucleären (rosa = WKY, rot = SHR) CaT-Parameter. \*  $P < 0,05$ ; WKY:  $n/N = 22/7$ , SHR:  $n/N = 22/4$ .

Es ließ sich ein deutlicher Unterschied bei der Verminderung des diastolischen Ca im Zellkern beobachten, welcher in SHR-Zellen um den Faktor von  $\sim 2,5$  stärker ausfiel ( $-0,36 \pm 0,06 F_0/F_{\text{rest}}$  in SHR vs.  $-0,14 \pm 0,08 F_0/F_{\text{rest}}$  in WKY;  $P < 0,05$ ; WKY:  $n/N = 22/7$ , SHR:  $n/N = 22/4$ ), wohingegen kein signifikanter Unterschied im Cytoplasma zu verzeichnen war ( $-0,28 \pm 0,06 F_0/F_{\text{rest}}$  in SHR vs.  $-0,16 \pm 0,08 F_0/F_{\text{rest}}$  in WKY;  $P = 0,474$ ). Der Anstieg des systolischen Ca zeigte sich im Trend bei den SHR-Zellen in beiden Kompartimenten stärker ausgeprägt, ohne dabei jedoch Signifikanzniveau zu erreichen (Cyto:  $5,04 \pm 0,54 F/F_{\text{rest}}$  in SHR vs.  $3,71 \pm 0,43 F/F_{\text{rest}}$  in WKY;  $P = 0,061$ ; Nuc:  $3,14 \pm 0,36 F/F_{\text{rest}}$  in SHR vs.  $2,31 \pm 0,31 F/F_{\text{rest}}$  in WKY;  $P = 0,087$ ). Der robuste ISO-Effekt der Vergrößerung der CaT-Amplituden fiel mit 37% im Cytoplasma ( $5,32 \pm 0,54 dF/F_{\text{rest}}$  in SHR vs.  $3,87 \pm 0,43 dF/F_{\text{rest}}$  in WKY;  $P < 0,05$ ) und 47% im Zellkern ( $3,50 \pm 0,36 dF/F_{\text{rest}}$  in SHR vs.  $2,38 \pm 0,31 dF/F_{\text{rest}}$  in WKY;  $P < 0,05$ ) signifikant stärker in SHR- als in WKY-Myozyten aus.

Bei der Analyse der kinetischen Parameter war die Verkürzung der Anstiegszeit im Nucleus in SHR-Zellen stärker ausgeprägt ( $-76 \pm 11$  ms in SHR vs.  $-43 \pm 10$  ms in WKY;  $P < 0,05$ ) während sich im Cytoplasma keine signifikante Verkürzung zeigte. Der Effekt einer beschleunigten Abfallskinetik der CaT war in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt (Cyto:  $-196 \pm 19$  ms in SHR vs.  $-162 \pm 18$  ms in WKY;  $P = 0,343$ ; Nuc:  $-390 \pm 39$  ms in SHR vs.  $-315 \pm 49$  ms in WKY;  $P = 0,236$ ; WKY:  $n/N = 22/7$ , SHR:  $n/N = 22/4$ )

Zusammenfassend zeigten sich eine stärkere Vergrößerung der cytosolischen und nucleären CaT-Amplituden nach ISO-Exposition in SHR- im Vergleich zu WKY-Zellen, sowie größere Effekte auf das diastolische Ca und die Anstiegszeit des CaT im Zellkern. Insgesamt waren die Unterschiede in der Effektstärke von ISO am stärksten im nucleären Ca zu finden. Interessanterweise zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Änderung der Abfallszeitkonstanten, was darauf hindeutet, dass die ISO-induzierte Steigerung der SERCA-Aktivität in beiden Gruppen ähnlich groß war, während Hinweise für eine höhere basale SERCA-Aktivität in SHR-Myozyten vorliegen.

## 4. Diskussion

Die Bedeutung des nucleären Ca in der Physiologie und Pathologie des Herzens wurde lange Zeit nicht ausreichend verstanden. Jüngste Studien zeigen die nucleäre Ca-Regulation in einem klaren Zusammenhang mit der physiologischen Kontrolle der Genexpression und mit der Pathogenese von kardialen Erkrankungen wie Hypertrophie, Rhythmusstörungen und Herzinsuffizienz (Bootman et al., 2009; Chen-Izu et al., 2007; Dewenter et al., 2017; Domínguez-Rodríguez et al., 2012; Ljubojevic et al., 2014; Ljubojevic & Bers, 2015; Olivares-Florez et al., 2018; Plackic et al., 2016; Wehrens & Marks, 2004). Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, die zellulären Mechanismen der nucleären Ca-Regulation zu kennen und zu verstehen.

Die vorliegende Arbeit identifiziert das cytoplasmatische Ca und die SERCA-Aktivität als wichtigste Determinanten des systolischen CaT im Zellkern. Sie zeigt weiterhin, dass die Modulation der perinucleären Ca-Speicher für die Regulation des Kernkalziums nur eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Befunde konnten in einem Tiermodell der hypertensiven Herzerkrankung bestätigt werden.

### 4.1 Methodische Aspekte der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde die subzelluläre Ca-Regulation in isolierten Ventrikelmyozyten mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops studiert. Diese Methode der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Messung von Zeitserien im Linescan-Modus und erlaubt dabei, Fluoreszenzsignale mit hoher zeitlicher ( $\sim 1$  ms) und ausreichender räumlicher Auflösung ( $< 1 \mu\text{m}$ ) aufzunehmen. Der hierbei genutzte Fluoreszenzindikator Fluo-4/AM eignete sich besonders gut für Studien der nucleären Ca-Regulation, da er sich nach der Aufnahme ins Cytoplasma auch im Zellkern anreichert (Ljubojevic et al., 2011; Plackic et al., 2016) und somit eine simultane Messung von cytoplasmatischen und nucleoplasmatischen Fluoreszenzsignalen erlaubt. Dies durch den Umstand begünstigt, dass die Zellkerne ventrikulärer Rattenmyozyten relativ groß sind ( $\sim 40 \mu\text{m}^2$  Fläche in der zentralen Z-Ebene) (Plackic et al., 2016), was

eine verlässliche Zuordnung der Signale aus Zellkern und Cytoplasma zuließ. Die dabei erhaltenen Fluoreszenzintensitätswerte wurden nicht kalibriert und lassen daher keine Aussagen über absolute Ca-Konzentrationen treffen. Ein direkter Vergleich von Änderungen der absoluten Ca-Konzentrationen zur Charakterisierung der nucleären und cytoplasmatischen Ca-Regulation ist somit nicht möglich. Jedoch können quantitative Auswertungen der relativen Fluoreszenzänderungen durchaus für das Treffen gültiger Aussagen genutzt werden, wenn dabei die bereits in Kiess & Kockskämper (2019) beschriebenen Einschränkungen berücksichtigt und die daraus resultierenden Grenzen der Validität beachtet werden. Dabei ist es wichtig zu bedenken, dass die Fluoreszenzeigenschaften von Fluo-4 sich bekanntermaßen in den verschiedenen Kompartimenten unterscheiden; dies betrifft v.a. die Affinität des Fluoreszenzindikators für Ca-Ionen und zeigt sich im Nucleus durch einen niedrigeren apparenten  $K_d(\text{Ca})$ -Wert verglichen mit dem für das Cytosol ermittelten (Plackic et al., 2016). Dies führt beispielsweise dazu, dass Änderungen des nucleären Ca und auch aus ihnen berechnete Kern-Cyto-Verhältnisse tendenziell unterschätzt werden, weil die Ca-Konzentration im Kern sowohl in ruhenden Zellen als auch in der Diastole höher ist als im Cytoplasma (Ljubojevic et al., 2011; Plackic et al., 2016). Auch die Kinetik des CaT-Abfalls muss mit einiger Vorsicht interpretiert werden, da man hier Abweichungen nach einer Kalibrierung durch die unterschiedliche Dissoziationskinetik auf Grund der differenten Ca-Bindungseigenschaften von Fluo-4 im Cytoplasma gegenüber dem Zellkern erwarten muss. Die Anstiegszeit des Ca-T wird davon jedoch nicht betroffen. Das Gleiche gilt für den Unterschied zwischen dem deutlich langsameren nucleären CaT-Abfall und dem cytoplasmatischen CaT-Abfall (Ljubojevic et al., 2011), der auch bei Verwendung kalibrierter Ca-Daten weiter besteht.

Im Rahmen dieser Studie wurden bei der Konzeptionierung der Versuche weiterhin Maßnahmen erarbeitet, die den genannten Einschränkungen Rechnung tragen sollten. Dazu wurden die Experimente als gepaarte Versuche durchgeführt, bei denen (mit Ausnahme von Abb. 3-15 und Abb. 3-21) stets Vergleiche innerhalb einzelner Gruppen angestellt wurden. Wenn eine Intervention dabei den CaT-Abfall, das diastolische oder systolische Ca ändert, würden sich zwar die absoluten Änderungen nach einer Kalibrierung von denen vor der Kalibrierung unterscheiden, aber die Richtung der

Änderung bliebe die gleiche. Dies gilt auch für die Kern-Cyto-Diagramme: Hier würde sich womöglich die Steigung ändern, jedoch bliebe die Aussage unverändert, dass das nucleäre Ca vom cytoplasmatischen Ca abhängt und dass höhere nucleoplasmatische Ca-Werte mit höheren cytoplasmatischen Werten korrelieren. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass die Validität der Kernaussagen meiner Arbeit, dass das cytoplasmatische Ca die Hauptdeterminante des nucleären Ca darstellt und die SERCA-Aktivität den nucleoplasmatischen Ca-Anstieg moduliert, nicht davon betroffen ist, dass in dieser Studie Fluo-4-Fluoreszenzdaten anstelle von kalibrierten Ca-Konzentrationen verwendet wurden (Kiess & Kockskämper, 2019).

## **4.2            Der cytoplasmatische CaT bildet die Grundlage für den systolischen Ca-Anstieg im Nucleus**

Ca-Ionen gelangen über die Kernporenkomplexe (NPC) durch passive Diffusion in den Zellkern. Dabei sind die NPC nicht nur an der Oberfläche der Kernhülle (NE) lokalisiert; die vom NE in Kardiomyozyten ausgebildeten Invaginationen, welche mit ihren verzweigten, tubulären Strukturen bis tief in das Zentrum des Zellkerns reichen, weisen ebenfalls NPC auf (Alonso & García-Sancho, 2011; Bootman et al., 2009). Durch diesen Umstand wird die Diffusion zwischen den Kompartimenten beschleunigt, indem die Diffusionsstrecke vom Cytoplasma in das Zentrum des Nucleus verkürzt wird (Ljubojevic et al., 2014). Auf einem physiologischen Expressionsniveau der NPC weist die Kernhülle eine hohe Permeabilität für Ca auf. Dies legt nahe, dass der nucleoplasmatische CaT eine passive Folge des cytoplasmatischen CaT sein könnte. Diese Vermutung wird durch den Befund unterstützt, dass jeder cytoplasmatische CaT auch einen nucleoplasmatischen CaT hervorruft und Reize, die ein erhöhtes cytoplasmatisches Ca nach sich ziehen (z.B. mechanische Dehnung, erhöhte Herzfrequenz), ebenfalls zu einem Anstieg im nucleären Ca führen (Ljubojevic & Bers, 2015).

Der systolische CaT ist in seiner Größe variabel; so kann er z.B. während Phasen körperlicher Belastung durch Stimulation des Sympathikus zunehmen (Endoh & Blinks, 1988) oder im Rahmen einer bereits vorangeschrittenen Herzinsuffizienz abnehmen (Beuckelmann et al., 1992). Dabei wird das cytoplasmatische systolische Ca hauptsächlich durch 3 Faktoren gesteuert: (1) die Größe des L-Typ-Ca-Stroms ( $I_{Ca,L}$ ), wobei ein größerer  $I_{Ca,L}$  das Öffnen von mehr Ryanodinrezeptoren (RyR) auslöst, (2) die Offenwahrscheinlichkeit der RyR und (3) die Menge an gespeichertem Ca im SR (Eisner, 2018).

Es zeigte sich eine starke Abhängigkeit des systolischen Ca im Zellkern vom systolischen Ca im Cytoplasma. Diese konnte unter allen gewählten Versuchsbedingungen beobachtet werden. Als Erweiterung zu diesem grundlegenden Befund, der bereits früher berichtet wurde (Kockskämper et al., 2008b; Ljubojevic et al., 2011), konnte eine lineare Beziehung zwischen dem nucleären und cytoplasmatischen Ca bei sehr niedrigen Ca-Konzentrationen (bei 0,3 mM Ca) wie auch bei sehr hohen Ca-Konzentrationen (unter ISO-Stimulation) nachgewiesen werden (Abb. 3-11).

Die beiden experimentellen Vorgehensweisen basierten dabei auf folgenden Mechanismen: Durch die Verwendung einer Mess-Tyrode mit 0,3 mM Ca konnte im Verhältnis zur physiologischen Ca-Konzentration des Extrazellulärraums von ~1.3 mM eine beträchtliche Reduktion des elektrochemischen Gradienten für Ca-Ionen erzeugt und dazu benutzen werden, den L-Typ-Ca-Strom zu verringern. Damit wurde gleichzeitig die Ca-induzierte Ca-Freisetzung über die RyR aus dem SR deutlich verringert (Bers, 2001), was eine erhebliche Verkleinerung der cytoplasmatischen CaT nach sich zog. Auf der anderen Seite wurde Isoprenalin (ISO) zur Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren und so zur  $G_{\alpha_s}$ -vermittelten Aktivierung des cAMP-Signalwegs verwendet. Die dabei aus den PKA-vermittelten Phosphorylierungen resultierenden Modulationen Ca-regulierender Proteine (LTCC, RyR, PLB, TnI) entsprechen den Effekten einer Sympathikusstimulation auf Ventrikeldmyozyten (Kap. 1.2.4) und führen in Summe zu deutlich vergrößerten CaT.

Bei reduziertem extrazellulärem Ca von 0,3 mM führte die Abnahme des systolischen Ca im Cytoplasma um ~49% zu einer Abnahme des systolischen Ca im Zellkern um ~56% (Abb. 3-2). Nach der ISO-Applikation stieg das systolische Ca im Cytoplasma um 72% und gleichzeitig im Kern um 58% (Abb. 3-5).

Beide Interventionen beeinflussten das nucleäre Ca gleichsinnig und in einem ähnlichen Ausmaß wie jeweils das cytoplasmatische Ca. Dies deutet darauf hin, dass Änderungen des systolischen Ca im Nucleus direkt an Änderungen des systolischen Ca im Cytoplasma gekoppelt sind und legt einen Zusammenhang nahe, bei dem der systolische nucleäre Ca-Anstieg als passives Ereignis dem systolischen cytoplasmatischen Ca-Anstieg nachgeschaltet ist. Dabei ist die Diffusion von Ca über die Kernporen ein plausibler Mechanismus und wird durch die Tatsache gestützt, dass die NPC für Ca-Ionen leicht durchlässig sind und der nucleäre CaT mit einer zeitlichen Verzögerung gegenüber dem cytoplasmatischen CaT auftritt. Weiterhin ist bekannt, dass die Diffusion von Ca-Ionen innerhalb des Nucleoplasmas signifikant langsamer ist als im Cytosol (Soeller et al., 2003), was einen zusätzlichen Beitrag zur verlangsamten Kinetik der nucleären CaT leisten könnte und mit der Vorstellung eines diffusionsvermittelten nucleären CaT vereinbar ist.

Zusammengefasst zeigte sich eine lineare Abhängigkeit des nucleären systolischen CaT vom cytoplasmatischen systolischen CaT, die sich für eine Spannweite von sehr kleinen Ca-Konzentrationen bei 0,3 mM Ca bis zu sehr hohen Ca-Konzentrationen nach ISO-Gabe nachweisen lässt und darauf hindeutet, dass in Ventrikelmyozyten das cytoplasmatische systolische Ca die wichtigste Determinante des nucleären systolischen Ca darstellt (Kiess & Kockskämper, 2019).



### 4.3 Die SERCA moduliert den systolischen Ca-Anstieg im Nucleus

Die Ca-Propagation aus dem Cytoplasma in den Zellkern erschien während der TG-Applikation und bei 0,3 mM Ca erleichtert, worauf die vergrößerten Kern-Cyto-Verhältnisse (N/C) des systolischen Ca (Abb. 3-12) hindeuten. Dies zeigt sich ebenfalls anhand der deutlich steiler verlaufenden Regressionsgeraden in den Kern-Cyto-Diagrammen des systolischen Ca (Abb. 3-11). Auf der anderen Seite führte die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit ISO zu einem gegenteiligen Effekt und reduzierte das systolische N/C. Eine plausible Erklärung für diese Effekte liegt in einer Modulation der SERCA-Aktivität.

Thapsigargin (TG) hemmt als spezifischer, irreversibler Inhibitor die SERCA direkt und verringert dabei die Anzahl funktionsfähiger Ca-Pumpen, während bei 0,3 mM Ca die Reduktion der SERCA-Aktivität auf einen Ca-abhängigen Mechanismus zurückzuführen sein könnte. Dieser gehört zu den physiologischen Mechanismen der Modulation der Ca-Regulation. Dabei wird durch die Ca-abhängige Bildung des Ca-CaM-Komplexes die CaMKII aktiviert, welche daraufhin verschiedene Ca-Regulationsproteine phosphoryliert. Dazu gehört die Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) am T17, woraus eine Disinhibition der SERCA resultiert. Dieser Effekt ähnelt dem der unter Sympathikusstimulation ablaufenden PKA-abhängigen Phosphorylierung am S16 (Kap. 1.2.4) und führt zu einer vergleichbar hohen Absenkung des  $K_m(\text{Ca})$  der SERCA (Bers, 2001). Durch die Verringerung des systolischen CaT (bei 0,3 mM Ca) um ~50% wird die CaMKII-Aktivität reduziert und folglich wird durch verminderte Phosphorylierung von PLB die physiologische Hemmung der SERCA-Aktivität verstärkt. Neben der Ca-abhängigen Regulierung durch PLB könnten weitere Faktoren zur Reduzierung der SERCA-Aktivität beitragen. Änderungen in der Konzentration der Substrate ( $\text{Ca}^{2+}$  und ATP) könnten beispielsweise eine Rolle spielen. Wenn der systolische cytoplasmatische Ca-Spiegel um ~50% gesenkt wird, während die SR-Ca-Beladung sich gleichzeitig nur um ~25% verringert (Abb. 3-15), steigt dabei der Ca-Konzentrationsgradient zwischen Cytosol und SR-Lumen an, was die Arbeit der SR-Ca-Pumpe zusätzlich erschwert. Hinzu kommt eine niedrigere ATP-Konzentration im Cytosol, was auf eine verringerte

Stimulation der mitochondrialen ATP-Produktion durch verminderte Ca-Aufnahme zurückzuführen ist und einen Einfluss auf die Aktivität von ATP-abhängigen Enzymen hat (Glancy & Balaban, 2012; Williams et al., 2013).

Die Hypothese, dass die SERCA-Aktivität die systolische Ca-Propagation aus dem Cytosol in den Zellkern und damit den nucleären Ca-Anstieg beeinflusst, wird weiterhin gestützt durch die ISO-abhängige Reduktion des Kern-Cyto-Verhältnisses (Abb. 3-12). Dies deutet auf eine ISO-abhängige Verringerung des nucleären Ca-Anstiegs bei einer gegebenen cytoplasmatischen Ca-Konzentration hin. Die ISO-induzierte Steigerung der SERCA-Aktivität via  $\beta$ -AR- $G_q$ -cAMP-PKA-Signalweg in Kardiomyozyten stellt hierbei einen bekannten und gut erforschten Mechanismus dar (Bers, 2002; Kentish et al., 2001; Mattiazzi et al., 2005).

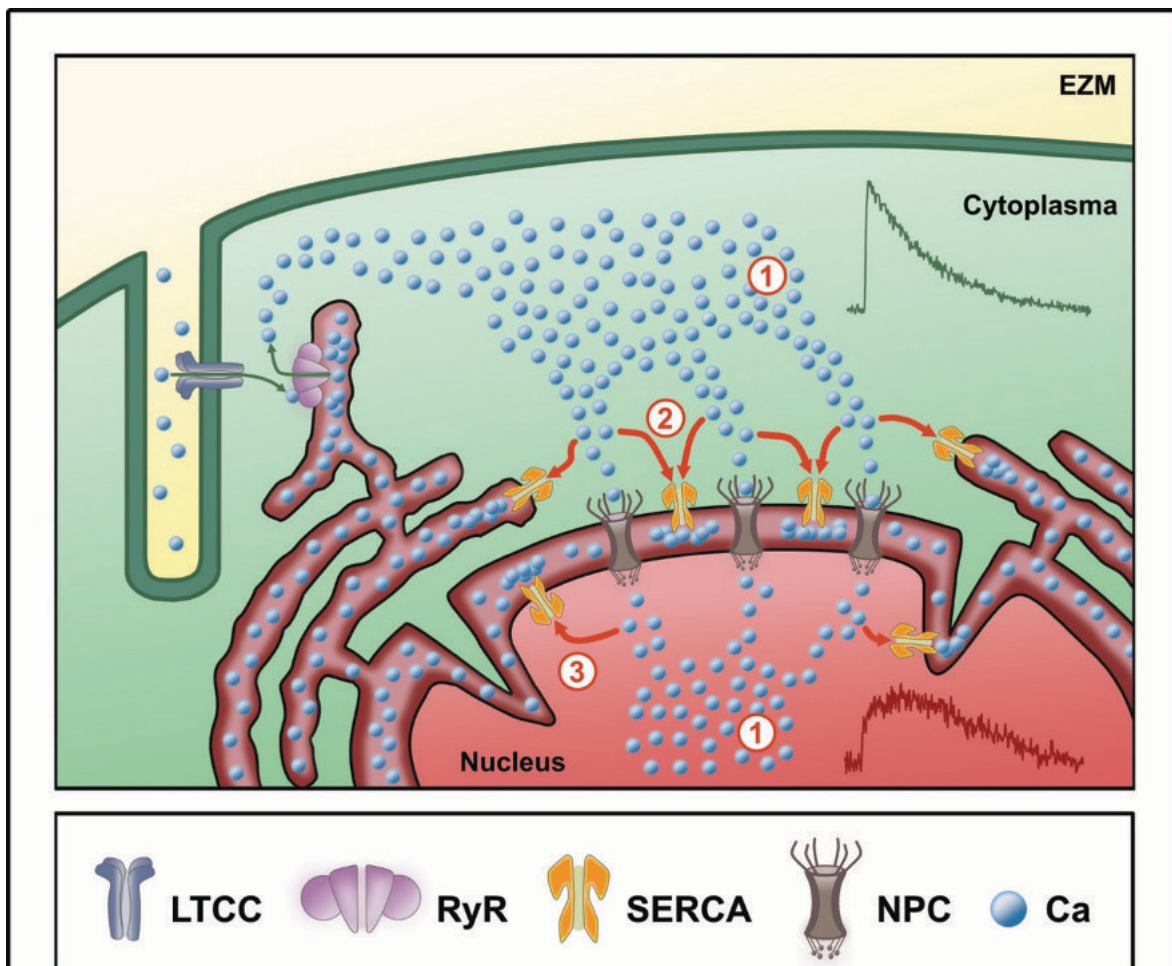
Die Auftragung des systolischen N/C in Abhängigkeit von  $\tau$  (Abb. 3-13, rechte Spalte) zeigt, dass erhöhte  $\tau$ -Werte bei 0,3 mM Ca mit einem höheren N/C assoziiert sind. Die durch ISO verringerten  $\tau$ -Werte entsprechen dabei im Diagramm den niedrigeren N/C. Eine annähernd lineare Beziehung zwischen  $\tau$  und N/C sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern und die Tatsache, dass  $\tau$  ein geeigneter Indikator für die SERCA-Aktivität ist, legen nahe, dass die SERCA einen direkten Einfluss auf die Ca-Propagation in den Nucleus hat. Dabei führt eine verstärkte SERCA-Aktivität zu einer erschwerten Ca-Propagation in den Zellkern (mit niedrigeren N/C), während eine Verminderung die Ca-Ausbreitung in den Nucleus erleichtert (und zu erhöhten N/C führt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Erhöhung der SERCA-Aktivität, wie sie unter ISO-Gabe auftrat, den systolischen Ca-Anstieg im Zellkern abschwächt, während eine Verminderung der SERCA-Aktivität, wie sie unter Thapsigargin oder bei reduziertem extrazellulären Ca zu finden war, den Ca-Anstieg im Zellkern verstärkt. Die Verstärkung des nucleären Ca-Anstiegs wurde anhand des reduzierten Kern-Cyto-Verhältnisses deutlich, sowie durch die verringerten Steigungen der Regressionsgeraden im Kern-Cyto-Diagramm. Demgegenüber zeigte sich die Abschwächung des nucleären Ca-Anstiegs am erhöhten Kern-Cyto-Verhältnis und durch die größeren

Steigungen der Regressionsgeraden im Kern-Cyto-Diagramm, was als besonders ausgeprägter Effekt bei der TG-Behandlung erkennbar war. TG führte darüber hinaus zu einem selektiven Anstieg des systolischen nucleoplasmatischen Ca, während das systolischen cytoplasmatischen Ca unverändert blieb (Abb. 3-8). Diese Beobachtung liefert einen direkten Beweis für die modulierende Funktion der SERCA auf den nucleären Ca-Anstieg und lässt vermuten, dass die physiologische SERCA-Aktivität einer Begrenzung des systolischen Ca-Anstiegs im Nucleus dient (Kiess & Kockskämper, 2019).

## 4.4 Modell der nucleären Ca-Regulation

Basierend auf den zuvor diskutierten Ergebnissen schlage ich das folgende Modell (aus Kiess & Kockskämper, 2019) für die Regulierung des systolischen CaT im Zellkern von ventrikulären Kardiomyozyten vor (Abb. 4-1):



**Abbildung 4-1 Die nucleäre Ca-Regulation in Ventrikulärmyozyten**

Während der Ca-induzierten Ca-Freisetzung (grüne Pfeile) strömt Ca aus der extrazellulären Matrix (EZM) über die L-Typ-Ca-Kanäle (LTCC) in den Kopplungsspalt zwischen der t-tubulären Zellmembran und dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Die Bindung von Ca an den Ryanodinrezeptor (RyR) setzt das gespeicherte Ca aus dem SR frei und führt damit zum systolischen Ca-Transienten (CaT) im Cytoplasma (#1). Der Ca-Gradient zwischen dem Cytosol und dem Nucleus treibt daraufhin die Diffusion von Ca-Ionen durch die Kernporenkomplexe (NPC) an. Dabei stellt die Höhe des cytoplasmatischen CaT (grüner CaT) die Hauptdeterminante des nucleoplasmatischen Ca-Anstiegs (roter CaT) dar. Der nucleäre Ca-Anstieg ist weiterhin abhängig von der Aktivität der in der Kernhülle und im perinucleären SR lokalisierten SERCA-Pumpen (#2), die aktiv die Menge an freiem Ca, das in den Zellkern diffundieren kann, reduzieren (rote Pfeile) und so den nucleoplasmatischen Ca-Anstieg begrenzen. Die SERCA-Pumpen in der inneren Kernmembran (#3) können dabei ebenfalls zur Modulation des systolischen Ca-Anstiegs im Nucleus beitragen.

(modifiziert nach Kiess & Kockskämper, 2019)

Initiiert durch den spannungsabhängigen L-Typ-Ca-Strom erfolgt der cytoplasmatische systolische Ca-Anstieg durch die Ca-induzierte Ca-Freisetzung über RyR in der SR-Membran im Bereich der Kopplungsspalte. Nachdem der cytoplasmatische Ca-Anstieg die (diastolische) nucleoplasmatische Ca-Konzentration überschritten hat, treibt der globale Ca-Gradient die passive Diffusion von cytoplasmatischem Ca in den Zellkern an. Unter physiologischen Bedingungen kann zwar die Ca-Freisetzung über die gesamte Zelle als annähernd homogen betrachtet werden, jedoch treten trotzdem variable lokale Ionenkonzentrationen innerhalb von Mikrodomänen auf (Bers, 2002). Bei der Ausbreitung der im Cytoplasma freigesetzten Ca-Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten passieren diese die NPC im NE und seinen Invaginationen und führen zur Erhöhung des nucleären Ca (#1 in Abb. 4-1). Daraus resultiert der systolische Ca-Anstieg im Zellkern, der mit einer Verzögerung gegenüber dem cytosolischen Ca-Anstieg auftritt. SERCA-Pumpen im NE und im perinucleären SR können aktiv die lokale Ca-Konzentration verändern, und damit die Diffusion durch die Kernporen und die Ca-Propagation in den Zellkern direkt beeinflussen (#2 in Abb. 4-1). Dabei konkurrieren die SERCA-Pumpen mit den NPC um die Ca-Ionen, indem sie diese in den NE bzw. das SR pumpen und so den lokalen Ca-Gradienten zwischen dem perinucleären Cytoplasma und dem Nucleoplasma verringern. Zusätzlich könnten auch SERCA-Pumpen, die sich in der inneren Kernmembran befinden, den systolischen Ca-Anstieg direkt aus dem Nucleoplasma heraus beeinflussen (#3 in Abb. 4-1). Die Modulation der SERCA-Aktivität wirkt sich über diesen Mechanismus direkt auf die Ca-Propagation aus: Eine Steigerung der SERCA-Aktivität, wie sie z.B. unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation auftritt, führt dazu, dass die Ca-Propagation in den Zellkern erschwert wird; eine Verringerung der SERCA-Aktivität erlaubt hingegen eine erleichterte Ca-Propagation in den Zellkern. Ultrastrukturelle Daten zur Lokalisation von SERCA und PLB im NE und seinen Invaginationen (Ljubojevic et al., 2014; Wu et al., 2016) unterstützen diese Modellvorstellung. Interessanterweise findet sich darüber hinaus in der Kernhülle ein erhöhtes PLB/SERCA-Verhältnis, was auf eine stärkere PLB-abhängige Regulation der SERCA in diesem Bereich hindeutet und eine höhere Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -adrenerger Stimulation (im Vergleich zu den SERCA-Pumpen im SR) impliziert.



Im Gesamtkontext verfügt der Zellkern mit den SERCA-Pumpen im NE und perinucleären SR über ein Instrument, mit dem er in der Lage ist, den nucleoplasmatischen Ca-Anstieg in der Systole aktiv zu begrenzen. Hierbei kommt der SERCA eine wichtige Rolle als Teil eines Schutzmechanismus zu, der zur Aufrechterhaltung der nucleären Ca-Homöostase dienen könnte und den Zellkern bei erhöhtem Sympathikotonus abschirmt und so vor einer (potenziell schädlichen) Ca-Überladung schützt.

### 4.5 Die perinucleären Ca-Speicher spielen eine nachrangige Rolle für die nucleäre Ca-Regulation

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten klar darauf hin, dass das cytoplasmatische Ca die wichtigste Determinante für das nucleäre systolische Ca darstellt. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass der nucleäre CaT einer spezifischen Kinetik folgt und zumindest teilweise unabhängig vom cytoplasmatischen CaT reguliert werden könnte (Ibarra et al., 2013; Kockskämper et al., 2008b; Wu et al., 2006b).

Der Zellkern verfügt über eigene Ca-Speicher, die mit Hilfe von Ca-Freisetzungskanälen im NE aktiv Ca in das Nucleoplasma freisetzen können (Chen et al., 2018; Escobar et al., 2011; Ibarra et al., 2013; Kockskämper et al., 2008b; Wu et al., 2006b; Zima et al., 2007) und einen nucleären Ca-Anstieg unabhängig von cytosolischen Ca-Signalen denkbar macht. So konnte gezeigt werden, dass über die Stimulation von  $G_{q_1}$ -gekoppelten Rezeptoren, z.B. mit ET-1, eine  $IP_3$ -vermittelte Ca-Freisetzung zu einem selektiven Anstieg des nucleären Ca führen kann (Kockskämper et al., 2008b). Darüber hinaus könnten auch RyR eine Rolle bei der Ca-Freisetzung aus der Kernhülle in Herzmuskelzellen spielen (Yang & Steele, 2005; Zima et al., 2007). Vor diesem Hintergrund war in Erwägung zu ziehen, dass auch die Ca-Speicher-Beladung der Kernhülle und die fraktionelle Ca-Freisetzung einen Einfluss auf den nucleären CaT haben könnten.

Zur Prüfung einer Abhängigkeit zwischen PN-Ca-Beladung und SR-Ca-Beladung wurden diese graphisch zueinander in Bezug gesetzt. Bei der Auftragung der PN-Ca-Beladung in Abhängigkeit von der SR-Ca-Beladung (Abb. 3-17A) zeigte sich eine lineare Beziehung. Diese bestand über einen weiten Bereich von Ca-Beladungen und zeigt, dass die NE-Ca-Beladung der SR-Ca-Beladung folgt. Daraus lässt sich schließen, dass diese beiden intrazellulären Ca-Speicher miteinander kommunizieren und dabei einen hohen Verbindungsgrad aufweisen, wie bereits zuvor berichtet wurde (Wu & Bers, 2006a).

Betrachtet man den Effekt der ISO-Gabe, so zeigte sich keine Änderung in der Beladung von SR und perinucleären Ca-Speichern. TG hingegen führte zu einer deutlichen Verringerung sowohl der SR-Ca-Beladung als auch der PN-Ca-Beladung. Dabei reduzierte TG die Ca-Beladung beider Speicherkompartimente in vergleichbarem Ausmaß, führte jedoch nur im Zellkern zu einem Anstieg des systolischen Ca (Abb. 3-8). Daraus wird erneut deutlich, welche große Bedeutung die SERCA-Aktivität für die Abschirmung des Zellkerns vor übermäßigem Ca-Anstieg während der elektrisch stimulierten CaT hat. Weiterhin zeigte sich bei 0,3 mM extrazellulärem Ca zwar eine Verminderung der SR-Ca-Beladung, jedoch nicht der PN-Ca-Beladung. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Kernhülle als Ca-Speicher-Kompartiment, obwohl sie mit dem SR verbunden ist, unter bestimmten Bedingungen weniger Ca verliert und das gespeicherte Ca besser halten kann als das SR.

Das systolische Ca im Zellkern zeigte bei der Auftragung in drei von vier Versuchsbedingungen eine lineare Abhängigkeit von der PN-Ca-Beladung (Abb. 3-17C). Diese positive Korrelation könnte darauf hindeuten, dass die PN-Ca-Beladung als Faktor bei der Regulierung des systolischen nucleären Ca eine Rolle spielt. Dabei gilt es jedoch folgendes zu berücksichtigen: Die PN-Ca-Beladung ist - wie gezeigt wurde - von der SR-Ca-Beladung abhängig; da die SR-Ca-Beladung jedoch die Höhe der Amplitude des cytosolischen CaT bestimmt, und dieser wiederum die Hauptdeterminante des nucleären CaT darstellt, muss angenommen werden, dass es sich womöglich eher um einen indirekten Zusammenhang zwischen PN-Ca-Beladung und systolischem nucleären Ca handelt.



Zusammengenommen lässt sich vermuten, dass die PN-Ca-Beladung für die Regulation des systolischen nucleären Ca keinen entscheidenden Faktor darstellt. Diese Annahme möchte ich (wie in Kiess & Kockskämper, 2019) anhand der folgenden Beweisführung belegen:

(1) Bei der Reduktion des extrazellulären Ca auf 0,3 mM Ca zeigte sich eine starke Verminderung des systolischen nucleären Ca, während sich dabei jedoch die PN-Ca-Beladung nicht änderte.

(2) Im Gegensatz dazu hat ISO das systolische nucleäre Ca deutlich erhöht, wiederum ohne eine Änderung der PN-Ca-Beladung herbeizuführen. Dies zeigt, dass starke Variationen des systolischen nucleären Ca bei nahezu identischen PN-Ca-Beladungen möglich sind (Abb. 3-15).

(3) Darüber hinaus führte die Verringerung der PN-Ca-Beladung unter TG sogar zu einer Erhöhung des systolischen nucleären Ca.

(4) Schließlich war das systolische Kern-Cyto-Verhältnis nicht von der PN-Ca-Beladung abhängig (Abb. 3-17D).

Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass Änderungen der PN-Ca-Beladung - wenn überhaupt - nur eine geringe Rolle bei der Regulierung des systolischen nucleären CaT spielen können.

Mit einer Größe von ~50% unter Kontrollbedingungen zeigte sich die fraktionelle Ca-Freisetzung (Abb. 3-16) aus den perinucleären Ca-Speichern ( $FR_{PN}$ ) kleiner als die FR aus den SR-Ca-Speichern ( $FR_{SR}$ ) von ~60% und entsprach damit früheren Befunden für atriale und ventrikuläre Myozyten (Kockskämper et al., 2008b; Plackic et al., 2016). Dieser Unterschied war unter allen getesteten Versuchsbedingungen zu beobachten und lässt sich durch die Tatsache erklären, dass der nucleäre Ca-Anstieg in der Systole vor allem von der passiven Diffusion von cytoplasmatischem Ca durch die Kernporen abhängt, während die aktive RyR-vermittelte Ca-Freisetzung aus dem NE und den

perinucleären Ca-Speichern nur einen geringen Beitrag leistet (Yang & Steele, 2005; Zima et al., 2007). Zusätzlich wird der Ca-Anstieg im Nucleus und in den perinucleären Bereichen aktiv durch die SERCA-Aktivität begrenzt.

Die durch die Reduktion der extrazellulären Ca-Konzentration auf 0,3 mM sowie durch die  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit ISO hervorgerufenen Änderungen der  $FR_{SR}$  zogen stets gleichsinnige Änderungen der  $FR_{PN}$  nach sich. Die TG-Applikation erhöhte zwar selektiv das systolische Ca im Zellkern, ließ dabei aber die FR aus beiden Ca-Speichern unverändert. Unter einer nahezu konstanten PN-Ca-Beladung (Abb. 3-15) wurden beachtliche Unterschiede in der  $FR_{PN}$  (Abb. 3-16) beobachtet, die von <20% bei 0,3 mM Ca bis hin zu ~60% nach ISO-Gabe reichten und nahelegen, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der PN-Ca-Beladung und der Größe der  $FR_{PN}$  besteht.

## **4.6 Die Regulation des diastolischen Ca im Nucleus**

Die diastolische Ca-Konzentration ist höher als die Ruhe-Ca-Konzentration eines unstimulierten Kardiomyozyten. In einer kontrahierenden Zelle ist das diastolische Ca das Ergebnis eines Gleichgewichts aus Ca-Influx und -Efflux, das sich hauptsächlich aus dem L-Typ-Ca-(Ein-)Strom, der SR-Ca-Freisetzung und -Wiederaufnahme sowie der Ca-Extrusion durch den Na/Ca-Austauscher (NCX) zusammensetzt (Eisner, 2018).

Es zeigte sich, dass das diastolische Ca im Nucleus typischerweise höher ist als im Cytoplasma, was mit früheren Studien mit kalibrierten Ca-Konzentrationen übereinstimmt (Ljubojevic et al., 2011; Plackic et al., 2016). Als Folge daraus ergaben sich für die Steigungen der Regressionsgeraden in den Kern-Cyto-Diagrammen (Abb. 3-9) Werte >1. Das gleiche gilt für die Kern-Cyto-Verhältnisse (Abb. 3-10) des diastolischen Ca. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür liegt darin, dass aufgrund der langsameren Abfallskinetik der nucleären CaT die Zeitspanne zwischen zwei Stimulationen nicht für eine Absenkung der Ca-Konzentration auf einen ähnlich niedrigen Wert wie im Cytoplasma ausreicht, was durch die Beobachtung gestützt wird, dass sich beim Wechsel zu höheren Stimulationsfrequenzen die diastolische Ca-Konzentration auf einem höheren Niveau einpendelt (Ljubojevic et al., 2011).

Die CaT im Zellkern unterscheiden sich mit einer deutlich längeren Abfallskinetik von denen im Cytoplasma. Bei letzteren konkurrieren die beiden Ca-Transportproteine NCX und SERCA um die Ca-Ionen und sorgen im Rahmen einer geregelten Abfolge von Kontraktion und Relaxation für einen schnellen Ca-Konzentrationsabfall. Auch in der Kernhülle lässt sich der NCX nachweisen, wo er in der inneren Kernmembran an der Oberfläche und entlang der Membraneinstülpungen lokalisiert ist und zur Wiederaufnahme von Ca-Ionen in das Lumen des NE beiträgt (Ledeer & Wu, 2007). Ebenso finden sich SERCA-Pumpen in der Kernhülle, die zwar auch in der inneren, aber präferenziell in der äußeren Kernmembran verteilt sind (Gerasimenko & Gerasimenko, 2004; Ljubojevic et al., 2014; Wu et al., 2016). Obwohl der NCX und die SERCA auch in der Kernhülle lokalisiert sind, lässt die deutlich langsamere Abfallskinetik der CaT im Zellkern darauf schließen, dass diese Mechanismen nur eingeschränkt für den nucleären Ca-Abfall zur Verfügung stehen. In ventrikulären Rattenmyozyten trägt die SERCA mit ~92% den größten Anteil des cytoplasmatischen CaT-Abfall, während der NCX mit einem Beitrag von ~7% weit weniger Bedeutung hat (Bers, 2002). Unter der Annahme, dass dieses Verhältnis auch auf den Abfall des nucleären CaT zutrifft, kommt der SERCA die Rolle als wichtigster Mechanismus zur Verringerung des nucleären Ca zu. Die verlangsamte Abfallskinetik des nucleären CaT erklärt sich dabei wie folgt: Vor dem Hintergrund, dass sich die höchste Konzentration der SERCA in der äußeren Schicht der Kernmembran befindet, müssen die Ca-Ionen zuerst durch die Kernporen aus dem Zellkern heraus diffundieren, um für eine quantitativ bedeutsame Wiederaufnahme zur Verfügung zu stehen, wodurch gegenüber einer direkten Aufnahme (wie im Cytosol durch das SR) eine zeitliche Verzögerung entsteht.

Die SERCA-Funktion hat als wichtigster Mechanismus für den CaT-Abfall einen großen Einfluss auf das diastolische Ca. Dies zeigte sich besonders unter der Hemmung mit TG, die zu einem deutlichen Anstieg des cytoplasmatischen und nucleären diastolischen Ca führte (Abb. 3-8). Unter ISO-Stimulation konnte im Gegensatz dazu eine Verringerung des diastolischen Ca in beiden Kompartimenten beobachtet werden (Abb. 3-5), was sich auf die Steigerung der SERCA-Aktivität durch die cAMP-PKA/CaMKII-vermittelte Phosphorylierung von PLB im SR bzw. im NE zurückführen lässt.

Die Ergebnisse der beiden experimentellen Ansätze (TG, ISO) zur Manipulation des  $Ca_{dia}$  deuten darauf hin, dass eine Zunahme bzw. Abnahme des cytoplasmatischen  $Ca_{dia}$  jeweils eine gleichsinnige Änderung des nucleoplasmatischen  $Ca_{dia}$  zur Folge hat. Desweiteren zeigen die Kern-Cyto-Diagramme für das diastolische Ca (Abb. 3-9) - ähnlich wie bereits für das systolische Ca beschrieben - eine lineare Beziehung zwischen dem diastolischen nucleären und cytoplasmatischen Ca über ein breites Spektrum von Ca-Konzentrationen mit vergleichbaren Steigungen von  $\sim 1,1$ - $1,3$ . Auch wenn das nucleäre diastolische Ca multifaktoriell reguliert wird und damit im Vergleich zum systolischen Ca komplexer zu verstehen ist, legen diese Befunde nahe, dass es zu einem großen Anteil vom Konzentrationsgradienten zwischen Cytosol und Zellkern abhängig ist und somit von passiver Diffusion bestimmt wird. Daraus lässt sich schließen, dass das cytoplasmatische Ca auch während der Diastole die Hauptdeterminante des nucleären Ca ist.

Das diastolische nucleäre Ca korrelierte unter den meisten experimentellen Bedingungen nicht mit der PN-Ca-Beladung (Abb. 3-17B). Lediglich in Gegenwart von ISO konnte eine signifikante Korrelation der beiden Parameter mit einer sehr flachen negativen Steigung beobachtet werden. Dies impliziert, dass die PN-Ca-Beladung keine wesentliche Rolle bei der Regulierung des Kernkalziums während der Diastole spielt.

In der Summe lässt sich sagen, dass die entscheidenden Faktoren für die nucleäre diastolische Ca-Regulation die (1) SERCA-Funktion sowie das (2) cytoplasmatische diastolische Ca darstellen, während der Kernhülle und den perinucleären Ca-Speichern in diesem Zusammenhang weit weniger Bedeutung zukommt.

## 4.7 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das SHR-Modell

Die SHR-Ratte entwickelt im Alter von 8-12 Wochen spontan einen Hypertonus, der zur Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie führt und im Alter von 15-24 Monaten schließlich in eine Herzinsuffizienz übergeht (Plackic, 2017). Dabei sind die Mechanismen, die an der Entwicklung der Pathologie beteiligt sind, bis heute nur unzureichend erforscht. Verschiedene Studien haben Erklärungsansätze geliefert; so könnte eine renale Dysfunktion ursächlich sein (Bianchi et al., 2002), während eine verstärkte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Shanks & Herring, 2013) und ein erhöhter Sympathikotonus (Brock et al., 1996) ebenfalls eine Rolle zu spielen scheinen. Aus früheren Studien an SHR-Ventrikelmyozyten ist bekannt, dass diese im Vergleich zu den Kontrollen (WKY oder Wistar) Unterschiede in der cytosolischen Ca-Regulation aufweisen und dabei v.a. größere cytoplasmatische CaT zeigen (Chen-Izu et al., 2007; Fowler et al., 2005; Plackic et al., 2016; Shorofsky et al., 1999). Neuere Studien ergaben bereits im Stadium der frühen Hypertonie (im Alter von 12-14 Wochen) einsetzende Änderungen auf der Ebene des nucleären Ca, wie z.B. ein verringertes diastolisches Ca bei gleichzeitig erhöhtem systolischem Ca und deutlich beschleunigter CaT-Abfallskinetik. Auch auf dem Expressionsniveau von (kern-) kalziumregulierenden Proteinen wurden Veränderungen beobachtet (Plackic et al., 2016).

Ziel der Versuchsserie an SHR-Myozyten in der vorliegenden Studie war die Überprüfung der Übertragbarkeit der aus den WKY-Ratten gewonnenen Erkenntnisse und NICHT, einen basalen Vergleich zwischen den Tiermodellen anzustellen. Da bereits Unterschiede in den basalen CaT-Charakteristika vorlagen, wie z.B. im systolischen Ca und der CaT-Amplitude, wurde ein Matching-Verfahren (vgl. Kap. 3.2.1) angewandt, welches annähernd gleiche Ausgangsbedingungen hinsichtlich der genannten Parameter schaffte, um so z.B. den Einfluss des cytoplasmatischen CaT auf den nucleären CaT auch in SHR untersuchen und mit den Beobachtungen aus den WKY-Ratten vergleichen zu können. Unterschiede, die von dem Matching nicht betroffen waren und dementsprechend auch danach weiterhin bestanden, waren ein verringertes

diastolisches Ca (Abb. 3-18) sowie eine beschleunigte CaT-Abfallszeit, welche in den SHR-Myozyten in beiden Kompartimenten zu finden waren. Diese deuten auf eine erhöhte basale SERCA-Aktivität hin.

Als Intervention für die Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den WKY-Myozyten auf das pathologische Tiermodell wurde erneut eine Isoprenalin-Applikation (ISO, 10 nM) gewählt. ISO ermöglichte hierbei die pharmakologische Manipulation des cytoplasmatischen CaT und gleichzeitig der SERCA-Aktivität. Die dabei an den SHR-Zellen beobachteten Effekte der ISO-Gabe (Abb. 3-19) waren qualitativ identisch mit denen der WKY-Zellen.

Es zeigte sich in SHR-Tieren ebenfalls eine starke Abhängigkeit des systolischen Ca im Nucleus vom systolischen Ca im Cytoplasma. Nach der ISO-Applikation ließ sich im Cytoplasma ein Anstieg um 116% und gleichzeitig im Nucleus um 96% beobachten (Abb. 3-19). Dies deutet darauf hin, dass der Zellkern die Änderungen des cytoplasmatischen Ca nachbildet, was einen Zusammenhang der beiden Kompartimente über passive Diffusion durch die Kernporen ebenfalls wahrscheinlich macht. Bei der Auftragung des nucleoplasmatischen systolischen Ca in Abhängigkeit vom cytoplasmatischen systolischen Ca in SHR-Zellen (Abb. 3-20B) ergab sich eine lineare Beziehung sowohl für die vergleichsweise niedrigen Ca-Werte unter Kontrollbedingungen als auch für die unter ISO-Applikation gewonnenen höheren Ca-Werte mit ähnlichen Steigungen wie die für die WKY-Zellen ermittelten. Hieraus lässt sich ableiten, dass auch in SHR-Myozyten das cytoplasmatische systolische Ca die Grundlage für den nucleären Ca-Anstieg darstellt.

Das diastolische nucleäre Ca in SHR-Ratten war ebenfalls höher als das diastolische cytoplasmatische Ca, was auf die langsamere Abfallskinetik des CaT im Zellkern verglichen mit dem CaT im Cytoplasma zurückzuführen ist und sich in einem Wert  $>1$  für das diastolische Kern-Cyto-Verhältnis (Abb. 3-20B, links) widerspiegelt. Unter ISO-Gabe zeigte sich eine Verringerung des diastolischen Ca im Cytoplasma, die gleichzeitig und in ähnlich starker Ausprägung auch im Zellkern zu verzeichnen war. Die Auftragung des nucleären diastolischen Ca als Funktion des cytoplasmatischen

diastolischen Ca im Kern-Cyto-Diagramm (Abb. 3-20A, links) ergab eine lineare Beziehung mit Steigungen von 1,2 (CTR) und 1,0 (ISO). Ähnlich wie bei den Beobachtungen in den WKY-Zellen deuten diese Befunde auf einen maßgeblichen Zusammenhang zwischen nucleärem und cytoplasmatischem diastolischen Ca hin.

Insgesamt konnte auch in SHR-Tieren eine streng-lineare Abhängigkeit des nucleären systolischen CaT vom cytoplasmatischen systolischen CaT gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass auch in den SHR-Zellen das cytoplasmatische systolische Ca die wichtigste Determinante des nucleären systolischen Ca darstellt.

Bei der  $\beta$ -adrenergen Stimulation mit ISO wurde eine deutliche Beschleunigung der Abfallskinetik der CaT verzeichnet (Abb. 3-19), was auf eine erhöhte SERCA-Aktivität zurückführen ist und sich in einer Verringerung der  $\tau$ -Werte um ~60% im Cytoplasma und Zellkern zeigte. Da für letzteres am ehesten die erhöhte Aktivität der SERCA-Pumpen im NE und perinucleären Bereich in Frage kommt, ließe sich nach dem von mir beschriebenen Modell (vgl. Kap. 4.3) eine Beeinträchtigung der Ca-Propagation in den Zellkern erwarten. Diese zeigte sich in der Tat vermindert, was aus dem verringerten systolischen Kern-Cyto-Verhältnis (Abb. 3-20B, rechts) der SHR-Zellen hervorging und eine wichtige Rolle der SERCA für den nucleären Ca-Anstieg in den SHR-Tieren analog zu den Beobachtungen in den WKY-Tieren nahelegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aus den Studien am physiologischen Tiermodell gewonnenen Ergebnisse und Befunde, dass das cytosolische Ca die Hauptdeterminante des nucleären Ca in der Systole ist und dass die SERCA-Aktivität den Ca-Anstieg im Nucleus begrenzen kann, in den Versuchen am pathologischen Modell reproduziert und bestätigt werden konnten.



## 4.8 Unterschiede zwischen den Tiermodellen

Beim Vergleich der Effektstärke von ISO zeigte sich für die SHR-Myozyten eine erhöhte CaT-Amplitude sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. Diese setzte sich aus der Kombination einer Tendenz zu verminderten diastolischen Ca-Werten (im Zellkern sogar signifikant) und einer Tendenz zu erhöhten systolischen Ca-Werten zusammen. Die erhöhten systolischen Ca-Werte könnten unter Berücksichtigung der Literatur auf eine gesteigerte RyR-Expression (Plackic et al., 2016) zurückzuführen sein, die unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation zu einer größeren RyR-Phosphorylierung und dadurch gesteigerten Ca-induzierten Ca-Freisetzung führt. Obwohl bereits für die Zeit der frühen Hypertonie eine erhöhte Expression der SERCA2a in SHR-Myozyten nachgewiesen wurde (Plackic et al., 2016), was mit dem Befund der basal erhöhten SERCA-Aktivität zusammenpasst und diesen erklären könnte, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Änderung der Abfallszeitkonstanten (Abb. 3-21E). Ähnlich wie bei der gesteigerten RyR-Expression ließe eine erhöhte SERCA-Dichte eine vermehrte Aktivierung (= Disinhibition) durch Phosphorylierung von PLB unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation und damit einen verhältnismäßig stärker ausgeprägten Effekt auf die Beschleunigung des CaT-Abfalls im Vergleich zu den WKY-Myozyten erwarten; dies war jedoch nicht der Fall.

Proteinanalysen an isolierten Zellkernen aus Ventrikelmyozyten von jungen SHR zeigten weiterhin eine erhöhte SERCA-Dichte in der Kernhülle (Plackic et al., 2016). Der ISO-induzierte Effekt auf das systolische Kern-Cyto-Verhältnis mit einer Reduktion von  $0,76 \pm 0,02$  auf  $0,68 \pm 0,02$   $F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$  in den SHR-Zellen (Abb. 3-20B, rechts) ähnelte dem, der in den WKY-Zellen (Abb. 3-12B) beobachtet wurde (von  $0,76 \pm 0,01$  auf  $0,70 \pm 0,02$   $F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyto}}$ ). Dies deutet darauf hin, dass auch die Steigerung der Aktivität der größeren Anzahl von SERCA-Pumpen in der Kernhülle durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation verhältnismäßig schwächer ausgeprägt war als erwartet. Hierbei könnte eine verringerte Expression von PLB eine Rolle spielen, die in ventrikulären Myozyten von jungen SHR nachgewiesen wurde und somit bei gleichzeitig vergrößerter SERCA2a-Expression zu einem erhöhten SERCA2a/PLB-Verhältnis führt (Plackic et al., 2016). Hieraus könnte eine verminderte PLB-vermittelte Regulation der SERCA-Pumpe

resultieren, die zusätzlich zur erhöhten basalen SERCA-Aktivität beiträgt und unter ISO-Stimulation weniger Spielraum für eine durch PLB-Phosphorylierung vermittelte Steigerung der SERCA-Aktivität lässt.

Zusammengefasst führt die Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in den SHR zu einem Missverhältnis aus einerseits einer stark erhöhten CaT-Amplitude im Cytoplasma und andererseits einer (nur) ähnlich stark ausgeprägten Stimulation der SERCA und annähernd gleich großer Ca-Propagation in den Zellkern wie in den WKY-Ratten. Vor dem Hintergrund eines erhöhten Sympathikotonus (Brock et al., 1996) in den SHR könnten durch dieses Missverhältnis vor allem erhöhte Ca-Konzentrationsspitzen während der Systole im Nucleus häufiger auftreten und dabei die CaMKII-vermittelte Aktivierung prohypertropher Gene gefördert werden.

## 4.9 Konklusion

Die vorliegende Studie zeigt, dass das systolische cytoplasmatische Ca die wichtigste Determinante für den systolischen nucleären Ca-Anstieg darstellt. Darüber hinaus liefert sie den Nachweis, dass die SERCA-Funktion die passive Ca-Propagation in den Zellkern auf direkte Weise moduliert und damit den nucleären Ca-Anstieg in der Systole begrenzen kann. Basierend auf den beschriebenen Ergebnissen (Abb. 4-1) schlage ich vor, dass (1) der nucleoplasmatische Ca-Anstieg in der Systole zu einem großen Teil und über einen weiten Bereich von systolischen Ca-Konzentrationen durch passive Diffusion von cytoplasmatischem Ca durch Kernporen verursacht wird; (2) die Propagation von Ca aus dem Cytoplasma in den Zellkern wird durch die SERCA in der Kernhülle und dem perinucleären SR reguliert. Die SERCA ist dabei in der Lage, den systolischen Ca-Anstieg im Nucleus zu begrenzen. (3) Unter physiologischen Bedingungen spielt die perinucleäre Ca-Speicherbeladung nur eine geringe Rolle für die Regulierung des nucleären Ca. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in einem Tiermodell der hypertensiven Herzerkrankung (SHR) zeigt deren Übertragbarkeit und deutet auf eine weitreichende Gültigkeit der Befunde hin. Schließlich konnte ein Missverhältnis von stark erhöhten CaT-Amplituden im Cytoplasma bei gleichzeitig im Verhältnis nur mäßig stark ausgeprägter Steigerung der SERCA-Aktivität unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation in SHR identifiziert werden.

Zum heutigen Zeitpunkt haben wir erst begonnen, die Mechanismen zu verstehen, die hinter der komplexen Natur der nucleären Ca-Regulation stehen. Angesichts der Tatsache, dass dieses vielseitige Ion so viele grundlegende zelluläre Funktionen kontrolliert, von denen die Genexpression möglicherweise eine der wichtigsten ist, und darüber hinaus ein Schlüsselement in einer Vielzahl von pathologischen Zuständen darstellt, wird das nucleäre Ca weiterhin ein fesselndes Thema zukünftiger Forschung sein.

## 5 Zusammenfassung

Calcium (Ca) ist ein ubiquitär verbreitetes Ion und ein vielseitiger Botenstoff in biologischen Systemen. Es ist an der Regulation einer Vielzahl wesentlicher zellulärer Prozesse beteiligt, die von der elektrischen Stimulation der Zelle und dem Metabolismus über Sekretionsvorgänge bis hin zum Zellzyklus und der Genexpression reichen. In Kardiomyozyten spielt das cytoplasmatische Ca die Schlüsselrolle in der elektromechanischen Kopplung, während das nucleäre Ca an der Regulation der Transkription beteiligt ist. Hieraus ergibt sich eine besondere Bedeutung im Zusammenhang mit pathologischen Zuständen wie den maladaptiven Umbauvorgängen (Remodeling) in der Entstehung der kardialen Hypertrophie, bei denen Störungen in der nucleären Ca-Regulation zur Aktivierung eines prohypertrophen Geneprogramms führen können. Umfangreiche Forschung in den letzten Jahrzehnten führte vor allem zu einem besseren Verständnis im Bereich der cytoplasmatischen Ca-Regulation. Die Regulation des nucleären Ca ist hingegen bisher nur unzureichend verstanden. Ziel dieser Studie war es daher, ein besseres Verständnis für die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen zur Regulation des nucleären Ca-Transienten (CaT) in Kardiomyozyten aus normalen und pathologischen Herzen zu erlangen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden nucleäre CaT in Ventrikelzellen von Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) untersucht. Die frisch isolierten, ventrikulären Myozyten wurden mit dem Ca-sensitiven Fluoreszenzindikator Fluo-4 beladen. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert. Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop im Linescan-Modus durchgeführt. Das Platzieren der Scanlinie in einer den Zellkern schneidenden Transversalebene der Zelle ermöglichte dabei die simultane Aufnahme von cytoplasmatischen und nucleoplasmatischen CaT. Die Regulation des nucleären CaT durch die folgenden Faktoren wurde untersucht: (1) Der cytoplasmatische CaT, (2) die sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Ca-ATPase (SERCA) und (3) intrazelluläre Ca-Speicher, d.h. das sarkoplasmatische Retikulum (SR) und die perinucleären (PN) Ca-Speicher einschließlich der Kernhülle.

Der cytoplasmatische CaT wurde durch Reduktion des extrazellulären Ca von 1,5 auf 0,3 mM und durch die Applikation von Isoprenalin (ISO, 10 nM) reduziert bzw. erhöht. Die Reduktion des extrazellulären Ca verringerte sowohl cytoplasmatische als auch nucleäre CaT in ähnlichem Maße (~50-55%). ISO hingegen erhöhte sowohl cytoplasmatische als auch nucleäre CaT in vergleichbarem Ausmaß (~60-70%). Die SERCA-Funktion wurde durch den selektiven Inhibitor Thapsigargin (TG, 5  $\mu$ M) blockiert. TG führte zu einem starken Anstieg des diastolischen Ca sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. Das systolische Ca stieg unter diesen Bedingungen hingegen nur im Nucleus an. Die Auftragung des diastolischen nucleären Ca als Funktion des diastolischen cytoplasmatischen Ca ergab eine lineare Beziehung über einen weiten Bereich von Ca-Konzentrationen. Ebenso zeigte die Auftragung des systolischen nucleären Ca als Funktion des systolischen cytoplasmatischen Ca eine streng-lineare Beziehung über ein breites Spektrum von Ca-Konzentrationen. Somit wurde (1) der cytoplasmatische CaT als die wichtigste Determinante des nucleären CaT identifiziert.

Unter Verwendung der Zeitkonstante  $\tau$  des CaT-Abfalls als Surrogatparameter für die SERCA-Aktivität zeigte sich, dass diese unter ISO zunahm, während sich unter reduziertem extrazellulären Ca und TG die SERCA-Aktivität verringerte. Zur Einschätzung der Ca-Propagation aus dem Cytoplasma in den Zellkern wurde das Verhältnis von nucleärem Ca zu cytoplasmatischem Ca (N/C) ermittelt. Eine erhöhte SERCA-Aktivität war mit einer erschwerten (= verminderten) systolischen Ca-Propagation in den Zellkern verbunden, d.h. das systolische N/C wurde reduziert. Im Gegensatz dazu erleichterte eine verringerte SERCA-Aktivität die Ausbreitung des systolischen Ca in den Nucleus, was sich anhand eines erhöhten systolischen N/C zeigte. Der zuletzt beschriebene Effekt war besonders ausgeprägt bei der SERCA-Hemmung durch TG. Damit stellte sich (2) die SERCA-Aktivität als neuartiger Faktor in der Regulation des systolischen Ca-Anstiegs im Zellkern heraus.

Für die Bestimmung der intrazellulären Ca-Speicherbeladung wurde eine schnelle Applikation von Koffein (10 mM) eingesetzt. Bei reduziertem extrazellulären Ca und unter TG zeigte sich eine verminderte SR-Ca-Beladung. Die PN Ca-Speicher-Beladung wurde jedoch nur durch TG reduziert. ISO hingegen hatte weder einen Effekt auf die SR- noch auf die PN-Ca-Beladung. Es ließ sich eine lineare Abhängigkeit der PN-Ca-

Beladung von der SR-Ca-Beladung verzeichnen, was auf einen hohen Vernetzungsgrad bis hin zu einem funktionell einheitlichen Ca-Speicherkompartiment hindeutet. Die Propagation des systolischen Ca in den Zellkern (d.h. das systolische N/C) war jedoch nicht von der PN-Ca-Speicherbeladung abhängig. Damit war (3) die PN-Ca-Speicherbeladung kein entscheidender Faktor für die Regulation des nucleären CaT.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Erkenntnisse aus dem physiologischen Tiermodell auf ein pathologisches Modell übertragen werden. Dafür wurden spontan-hypertensive Ratten (SHR) verwendet, ein gut charakterisiertes Krankheitsmodell für essentielle Hypertonie und hypertensive Herzerkrankung. Hier wurde erneut ISO verwendet, um die Ca-Regulation in ventrikulären Myozyten von SHR zu stimulieren. Ähnlich wie bei den Beobachtungen in WKY zeigte sich eine lineare Abhängigkeit des systolischen Ca im Nucleus vom systolischen Ca im Cytoplasma, was darauf hindeutet, dass der systolische nucleäre CaT auch in SHR vom systolischen cytoplasmatischen CaT bestimmt wird. Darüber hinaus erschwerte die ISO-induzierte SERCA-Stimulation die Ca-Propagation in den Zellkern (d.h. reduzierte das systolische N/C). Dies deutet darauf hin, dass auch in SHR der nucleäre Ca-Anstieg durch die SERCA-Aktivität moduliert wird. Während die  $\beta$ -adrenerge Stimulation das systolische cytoplasmatische Ca in SHR (um >110%) deutlich erhöhte, zeigte sich im Vergleich zu den WKY-Myozyten eine im Verhältnis nur mäßig stark ausgeprägte ISO-induzierte Steigerung der SERCA-Aktivität. Dieses Missverhältnis könnte unter einem erhöhten Sympathikotonus in SHR das Auftreten von hohen Ca-Konzentrationspitzen während der Systole im Nucleus begünstigen.

Zusammengefasst stellt die Arbeit das cytoplasmatische Ca als Hauptdeterminante des nucleären Ca-Anstiegs heraus und liefert den Nachweis, dass die SERCA-Funktion die passive Ca-Propagation vom Cytoplasma in den Kern direkt moduliert. Darüber hinaus spielt die perinucleäre Ca-Beladung unter physiologischen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation des nucleären Ca. Schließlich konnten die wichtigsten Ergebnisse aus den Studien an WKY-Ratten in SHR reproduziert werden, was die Befunde bestätigt und auf ihre Übertragbarkeit und Validität hindeutet.

## 6 Summary

Calcium (Ca) is a ubiquitous ion and versatile second messenger involved in the regulation of a variety of essential cellular processes, ranging from electrical stimulation and metabolism over secretion to cell cycle and gene expression. In cardiomyocytes, cytoplasmic Ca drives the contraction-relaxation cycle, whereas nuclear Ca is involved in regulation of transcription. This becomes particularly important under pathological conditions such as cardiac remodeling, where Ca signaling is impaired and pro-hypertrophic genes become (re-)expressed. Extensive research has been done on cytoplasmic Ca signaling which led to a better understanding these days. Nuclear Ca regulation, by contrast, is not well understood. The aim of this study, therefore, was to elucidate the cellular mechanisms underlying the regulation of nuclear calcium transients (CaTs) in cardiac myocytes from normal and diseased hearts.

In the first part, nuclear CaTs in ventricular myocytes from Wistar-Kyoto rats (WKY) were studied. Acutely isolated ventricular myocytes were loaded with the fluorescent calcium indicator Fluo-4. Cells were electrically stimulated at 1 Hz at room temperature. Cytoplasmic and nucleoplasmic CaTs were recorded simultaneously using the linescan mode of a laser-scanning confocal microscope with the scan line traversing the nucleus. Regulation of nuclear CaTs by the following factors was studied: (1) the cytoplasmic CaT, (2) the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca-ATPase (SERCA) and (3) intracellular Ca stores, i.e. the sarcoplasmic reticulum (SR) and perinuclear (PN) Ca stores including the nuclear envelope.

The cytoplasmic CaT was decreased and increased, respectively, by reduction of extracellular Ca from 1.5 to 0.3 mM and by exposure to isoprenaline (ISO, 10 nM). Reduction of extracellular Ca decreased both cytoplasmic and nuclear CaTs by a similar degree (~50-55%). ISO, on the other hand, increased both cytoplasmic and nuclear CaTs by a similar degree (~60-70%). SERCA function was blocked by the selective inhibitor thapsigargin (TG, 5  $\mu$ M). In the presence of TG, there was a large increase in diastolic Ca both in the cytoplasm and in the nucleus. Systolic Ca, however, increased only in the nucleus under these conditions. Plotting diastolic nuclear Ca as a function of diastolic cytoplasmic Ca revealed a linear relationship over a wide range of Ca concentrations. Likewise, plotting systolic nuclear Ca as a function of systolic cytoplasmic Ca revealed



a strict linear relationship over a wide range of Ca concentrations. Thus, (1) the cytoplasmic CaT was identified as the major determinant of the nuclear CaT.

Using the time constant  $\tau$  of CaT decay as a surrogate parameter for SERCA activity, it could be observed that ISO increased, whereas reduced extracellular Ca and TG decreased SERCA activity. Ca propagation from the cytoplasm into the nucleus was estimated by the ratio of nuclear Ca over cytoplasmic Ca (N/C). Increased SERCA activity was associated with impaired systolic Ca propagation into the nucleus, i.e. the systolic N/C was reduced. By contrast, decreased SERCA activity facilitated systolic Ca propagation into the nucleus as indicated by elevated systolic N/C. The latter effect was particularly pronounced during SERCA inhibition by TG. Therefore, (2) SERCA activity emerged as a novel factor regulating the systolic Ca increase in the nucleus.

Intracellular Ca store load was determined using rapid application of caffeine (10 mM). Reduction of extracellular Ca and TG reduced SR Ca load. PN Ca store load, however, was only reduced by TG. ISO, by contrast, did not alter either SR nor PN load. There was a linear dependence of PN Ca load on SR Ca load suggesting a common, highly interconnected Ca storage compartment. Systolic Ca propagation into the nucleus (i.e. the systolic N/C), however, was not dependent on PN Ca store load. Thus, (3) PN Ca store load was not a decisive factor for regulation of nuclear CaTs.

In the second part, the findings obtained from the physiological animal model were to be transferred to a pathological model. Spontaneously hypertensive rats (SHR) were used, a well characterized disease model for essential hypertension and hypertensive heart disease. Again, ISO was used to stimulate Ca signaling in SHR ventricular myocytes. Similar to the observations made in WKY myocytes, there was a linear dependence of the systolic nuclear Ca on the systolic cytoplasmic Ca, suggesting that the systolic nuclear CaT in SHR is also determined by the cytoplasmic systolic CaT. Moreover, ISO-induced SERCA stimulation impaired Ca propagation into the nucleus (i.e. reduced the systolic N/C), implying that SERCA activity also modulates the nuclear Ca increase here. While  $\beta$ -adrenergic stimulation markedly increased systolic cytoplasmic Ca (by >110%) in SHR, increase of SERCA activity was relatively moderately pronounced when compared to WKY myocytes. Under an increased sympathetic tone in SHR, this disproportion could increase the likelihood of high Ca concentration peaks during systole in the nucleus.

In conclusion, this study reveals the cytoplasmic CaT as the most important determinant of the nuclear Ca increase and provides evidence that SERCA function directly modulates passive Ca propagation into the nucleus. Moreover, under physiological conditions, perinuclear Ca load only plays a minor role in the regulation of nuclear Ca. Finally, the major results from WKY rats could be reproduced in SHR, which confirmed the findings and provides an indication of their transferability and validity.

## Literaturverzeichnis

- Alonso, M. T., & García-Sancho, J. (2011). Nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. *Cell Calcium*, 49(5), 280–289. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.004>
- Ammon, H. P. T. (2010). *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch* (10 ed.). Berlin/New York: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.
- Andersen, T., López, C., Manczak, T., Martinez, K., & Simonsen, H. (2015). Thapsigargin—From Thapsia L. to Mipsagargin. *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(4), 6113–6127. <http://doi.org/10.3390/molecules20046113>
- Anderson, M. E., Braun, A. P., Schulman, H., & Premack, B. A. (1994). Multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase mediates  $\text{Ca}^{2+}$ -induced enhancement of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in rabbit ventricular myocytes. *Circulation Research*, 75(5), 854–861. <http://doi.org/10.1161/01.res.75.5.854>
- Aumüller, G., Aust, G., & Doll, A. (2014). *Duale Reihe Anatomie*. 3. Aufl., Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Backs, J., & Olson, E. N. (2006). Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circulation Research*, 98(1), 15–24. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000197782.21444.8f>
- Backs, J., Backs, T., Neef, S., Kreusser, M. M., Lehmann, L. H., Patrick, D. M., et al. (2009). The  $\delta$  isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2342–2347. <http://doi.org/10.1073/pnas.0813013106>
- Baddeley, D., Jayasinghe, I. D., Lam, L., Rossberger, S., Cannell, M. B., & Soeller, C. (2009). Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22275–22280. <http://doi.org/10.1073/pnas.0908971106>
- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(6), 940–950. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.018>
- Benitah, J.-P., Alvarez, J. L., & Gómez, A. M. (2010). L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1), 26–36. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.07.026>
- Berlin, J. R., Cannell, M. B., & Lederer, W. J. (1989). Cellular origins of the transient inward current in cardiac myocytes. Role of fluctuations and waves of elevated intracellular calcium. *Circulation Research*, 65(1), 115–126.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and Remodeling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <http://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. <http://doi.org/10.1038/35036035>
- Bers, D. M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* (Second Edition). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. <http://doi.org/10.1007/978-94-010-0658-3>
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205. <http://doi.org/10.1038/415198a>

- Bers, D. M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes., 70(1), 23–49. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455>
- Bers, D. M. (2015). Adrenergic Fight-or-Flight: S-NO Falls on PKA Targets. *Circulation Research*, 117(9), 747–749. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307397>
- Beuckelmann, D. J., Näbauer, M., & Erdmann, E. (1992). Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation*, 85(3), 1046–1055.
- Bianchi, G., Fox, U., Di Francesco, G. F., Giovanetti, A. M., & Pagetti, D. (1974). Blood Pressure Changes Produced by Kidney Cross-Transplantation between Spontaneously Hypertensive Rats and Normotensive Rats. *Clinical Science*, 47(5), 435–448. <http://doi.org/10.1042/cs0470435>
- Bootman, M. D., Bootman, M. D., Fearnley, C., Fearnley, C., Smyrniak, I., Smyrniak, I., et al. (2009). An update on nuclear calcium signalling., 122(Pt 14), 2337–2350. <http://doi.org/10.1242/jcs.028100>
- Brock, J. A., Van Helden, D. F., Dosen, P., & Rush, R. A. (1996). Prevention of high blood pressure by reducing sympathetic innervation in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 61(2), 97–102.
- Brooksby, P., Levi, A. J., & Jones, J. V. (1993). Investigation of the mechanisms underlying the increased contraction of hypertrophied ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat. *Cardiovascular Research*, 27(7), 1268–1277.
- Bruchhausen, von, F., Ebel, S., Frahm, A. W., & Hackenthal, E. (1993). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis* (5 Ed.). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Bünemann, M., Gerhardstein, B. L., Gao, T., & Hosey, M. M. (1999). Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 33851–33854.
- Capelson, M., Doucet, C., & Hetzer, M. W. (2010). Nuclear pore complexes: guardians of the nuclear genome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75(0), 585–597. <http://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.059>
- Chen, M., Xu, D., Wu, A. Z., Kranias, E., Lin, S.-F., Chen, P.-S., & Chen, Z. (2018). Phospholamban regulates nuclear Ca<sup>2+</sup> stores and inositol 1,4,5-trisphosphate mediated nuclear Ca<sup>2+</sup> cycling in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 123, 185–197. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.09.008>
- Chen-Izu, Y., Chen, L., Banyasz, T., McCulle, S. L., Norton, B., Scharf, S. M., et al. (2007). Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(6), H3301–10. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00259.2007>
- Cortés, R., Cortes, R., Roselló-Lletí, E., Rosello-Lleti, E., Rivera, M., Martínez-Dolz, L., et al. (2010). Influence of heart failure on nucleocytoplasmic transport in human cardiomyocytes., 85(3), 464–472. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvp336>
- Davis, L. I. (1995). The nuclear pore complex. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 865–896. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.004245>
- Dewenter, M., Lieth, von der, A., Katus, H. A., & Backs, J. (2017). Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 121(8), 1000–1020. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310355>

- Doggrell, S. A., & Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research*, 39(1), 89–105.
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., & Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by  $\text{Ca}^{2+}$  response amplitude and duration. *Nature*, 386(6627), 855–858. <http://doi.org/10.1038/386855a0>
- Domínguez-Rodríguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Benitah, J.-P., & Gómez, A. M. (2012). The other side of cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  signaling: transcriptional control. *Frontiers in Physiology*, 3. <http://doi.org/10.3389/fphys.2012.00452>
- Echevarría, W., Leite, M. F., Guerra, M. T., Zipfel, W. R., & Nathanson, M. H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature Cell Biology*, 5(5), 440–446. <http://doi.org/10.1038/ncb980>
- Eckart, W. U. (2009). *Geschichte der Medizin*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. <http://doi.org/10.1007/978-3-662-02616-8>
- Eisner, D. A. (2018). Ups and downs of calcium in the heart. *The Journal of Physiology*, 596(1), 19–30. <http://doi.org/10.1113/JP275130>
- Eisner, D., Bode, E., Venetucci, L., & Trafford, A. (2013). Calcium flux balance in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 58, 110–117. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.017>
- Endoh, M., & Blinks, J. R. (1988). Actions of sympathomimetic amines on the  $\text{Ca}^{2+}$  transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  mediated through alpha- and beta-adrenoceptors. *Circulation Research*, 62(2), 247–265.
- Escobar, M., Cardenas, C., Colavita, K., Petrenko, N. B., & Franzini-Armstrong, C. (2011). Structural evidence for perinuclear calcium microdomains in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(3), 451–459. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.11.021>
- Fabiato, A., & Fabiato, F. (1975). Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *The Journal of Physiology*, 249(3), 469–495. [http://doi.org/10.1111/\(ISSN\)1469-7793](http://doi.org/10.1111/(ISSN)1469-7793)
- Farrell, E. F., Antaramian, A., Rueda, A., Gómez, A. M., & Valdivia, H. H. (2003). Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34660–34666. <http://doi.org/10.1074/jbc.M305931200>
- Fawcett, D. W., & McNutt, N. S. (1969). THE ULTRASTRUCTURE OF THE CAT MYOCARDIUM: I. Ventricular Papillary Muscle. *The Journal of Cell Biology*, 42(1), 1–45. <http://doi.org/10.1083/jcb.42.1.1>
- Fill, M., & Copello, J. A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological Reviews*, 82(4), 893–922. <http://doi.org/10.1152/physrev.00013.2002>
- Fowler, M. R., Naz, J. R., Graham, M. D., Bru-Mercier, G., Harrison, S. M., & Orchard, C. H. (2005). Decreased  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion via  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in epicardial left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 288(5), H2431–8. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01069.2004>
- Galva, C., Artigas, P., & Gatto, C. (2012). Nuclear  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase plays an active role in nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 24), 6137–6147. <http://doi.org/10.1242/jcs.114959>

- Ganesan, A. N., Maack, C., Johns, D. C., Sidor, A., & O'Rourke, B. (2006). Beta-adrenergic stimulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in cardiac myocytes requires the distal carboxyl terminus of  $\alpha_1\text{C}$  but not serine 1928. *Circulation Research*, 98(2), e11–8. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000202692.23001.e2>
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4  $\text{Ca}^{2+}$ -indicator dyes. *Cell Calcium*, 27(2), 97–106. <http://doi.org/10.1054/ceca.1999.0095>
- Gerasimenko, O., & Gerasimenko, J. (2004). New aspects of nuclear calcium signalling. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 15), 3087–3094. <http://doi.org/10.1242/jcs.01295>
- Ginsburg, K. S., & Bers, D. M. (2004). Modulation of excitation–contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR  $\text{Ca}^{2+}$  load and  $\text{Ca}^{2+}$  current trigger. *The Journal of Physiology*, 556(2), 463–480. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.055384>
- Glancy, B., & Balaban, R. S. (2012). Role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*, 51(14), 2959–2973. <http://doi.org/10.1021/bi2018909>
- Gruver, C. L., DeMayo, F., Goldstein, M. A., & Means, A. R. (1993). Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. *Endocrinology*, 133(1), 376–388. <http://doi.org/10.1210/endo.133.1.8319584>
- Hagen, B. M., Boyman, L., Kao, J. P. Y., & Lederer, W. J. (2012). A comparative assessment of fluo  $\text{Ca}^{2+}$  indicators in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium*, 52(2), 170–181. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.05.010>
- Harzheim, D., Movassagh, M., Foo, R. S.-Y., Ritter, O., Tashfeen, A., Conway, S. J., et al. (2009). Increased  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  in the junctional sarcoplasmic reticulum augment  $\text{Ca}^{2+}$  transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27), 11406–11411. <http://doi.org/10.1073/pnas.0905485106>
- Hänsel, R., & Sticher, O. (2010). *Pharmakognosie, Phytopharmazie* (9 ed., pp. 1–1465). Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(8), 589–600. <http://doi.org/10.1038/nrm1983>
- Heineke, J., & Ritter, O. (2012). Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(1), 62–73. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.10.018>
- Hibberd, M. G., & Jewell, B. R. (1982). Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *The Journal of Physiology*, 329, 527–540. [http://doi.org/10.1111/\(ISSN\)1469-7793](http://doi.org/10.1111/(ISSN)1469-7793)
- Ibarra, C., Ibarra, C., Vicencio, J. M., Vicencio, J. M., Estrada, M., Estrada, M., et al. (2013). Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors. *Circulation Research*, 112(2), 236–245. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.273839>



- Irie, T., Sips, P. Y., Kai, S., Kida, K., Ikeda, K., Hirai, S., et al. (2015). S-Nitrosylation of Calcium-Handling Proteins in Cardiac Adrenergic Signaling and Hypertrophy. *Circulation Research*, 117(9), 793–803. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307157>
- James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M., & Carafoli, E. (1989). Nature and site of phospholamban regulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*, 342(6245), 90–92. <http://doi.org/10.1038/342090a0>
- Johnson, I., & Spencer, M. (2010). *Molecular Probes Handbook* (11 ed.).
- Kambayashi, M., Miura, T., Oh, B. H., Rockman, H. A., Murata, K., & Ross, J. (1992). Enhancement of the force-frequency effect on myocardial contractility by adrenergic stimulation in conscious dogs. *Circulation*, 86(2), 572–580. <http://doi.org/10.1161/01.cir.86.2.572>
- Kapur, S., Aistrup, G. L., Sharma, R., Kelly, J. E., Arora, R., Zheng, J., et al. (2010). Early development of intracellular calcium cycling defects in intact hearts of spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 299(6), H1843–H1853. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00623.2010>
- Karpinski, S. V., & Györke, S. (2001). Modulation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release cascade by  $\beta$ -adrenergic stimulation in rat ventricular myocytes. *The Journal of Physiology*, 533(3), 837–848. <http://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00837.x>
- Keminer, O., & Peters, R. (1999). Permeability of single nuclear pores. *Biophysical Journal*, 77(1), 217–228. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76883-9](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76883-9)
- Kentish, J. C., Keurs, ter, H. E., Ricciardi, L., Bucx, J. J., & Noble, M. I. (1986). Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of calcium concentrations on these relations. *Circulation Research*, 58(6), 755–768.
- Kentish, J. C., McCloskey, D. T., Layland, J., Palmer, S., Leiden, J. M., Martin, A. F., & Solaro, R. J. (2001). Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circulation Research*, 88(10), 1059–1065.
- Kiess, T.-O., & Kockskämper, J. (2019). SERCA Activity Controls the Systolic Calcium Increase in the Nucleus of Cardiac Myocytes. *Frontiers in Physiology*, 10, 517. <http://doi.org/10.3389/fphys.2019.00056>
- Kirby, M. S., Sagara, Y., Gaa, S., Inesi, G., Lederer, W. J., & Rogers, T. B. (1992). Thapsigargin inhibits contraction and  $\text{Ca}^{2+}$  transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *Journal of Biological Chemistry*, 267(18), 12545–12551.
- Kockskämper, J. (2016). Excitation-contraction coupling of cardiomyocytes. In K.-D. Schlüter (Ed.), *Cardiomyocytes – Active Players in Cardiac Disease* (pp. 67–96). Cham: Springer.
- Kockskämper, J., Zima, A. V., Zima, A. V., Roderick, H. L., Roderick, H. L., et al. (2008a). Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(2), 128–147. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.05.014>



- Kockskämper, J., Seidlmayer, L., Walther, S., Hellenkamp, K., Maier, L. S., & Pieske, B. (2008b). Endothelin-1 enhances nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  transients in atrial myocytes through  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -dependent  $\text{Ca}^{2+}$  release from perinuclear  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Journal of Cell Science*, 121(2), 186–195. <http://doi.org/10.1242/jcs.021386>
- Kockskämper, J., Sheehan, K. A., Bare, D. J., Lipsius, S. L., Mignery, G. A., & Blatter, L. A. (2001). Activation and Propagation of  $\text{Ca}^{2+}$  Release during Excitation-Contraction Coupling in Atrial Myocytes. *Biophysical Journal*, 81(5), 2590–2605. [http://doi.org/10.1016/s0006-3495\(01\)75903-6](http://doi.org/10.1016/s0006-3495(01)75903-6)
- Kohl, T., Westphal, V., Hell, S. W., & Lehnart, S. E. (2013). Superresolution microscopy in heart - cardiac nanoscopy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 58, 13–21. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.016>
- Kokubo, M., Uemura, A., Matsubara, T., & Murohara, T. (2005). Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 28(7), 601–609. <http://doi.org/10.1291/hypres.28.601>
- Kong, H., Jones, P. P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H. J., & Chen, S. R. W. (2008). Caffeine induces  $\text{Ca}^{2+}$  release by reducing the threshold for luminal  $\text{Ca}^{2+}$  activation of the ryanodine receptor. *The Biochemical Journal*, 414(3), 441–452. <http://doi.org/10.1042/BJ20080489>
- Kranias, E. G., & Hajjar, R. J. (2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circulation Research*, 110(12), 1646–1660. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.259754>
- Ledeen, R. W., & Wu, G. (2007). Sodium-calcium exchangers in the nucleus: an unexpected locus and an unusual regulatory mechanism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1099(1), 494–506. <http://doi.org/10.1196/annals.1387.057>
- Lee, M. A., Dunn, R. C., Clapham, D. E., & Stehno-Bittel, L. (1998, February). Calcium regulation of nuclear pore permeability. *Cell Calcium*, 23/(2/3), 91-101
- Lemke, T., Welling, A., Christel, C. J., Blaich, A., Bernhard, D., Lenhardt, P., et al. (2008). Unchanged beta-adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in  $\text{Ca}_v1.2$  phosphorylation site S1928A mutant mice. *Journal of Biological Chemistry*, 283(50), 34738–34744. <http://doi.org/10.1074/jbc.M804981200>
- Ljubojevic, S., & Bers, D. M. (2015). Nuclear calcium in cardiac myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65(3), 211–217. <http://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000174>
- Ljubojevic, S., Radulovic, S., Leitinger, G., Sedej, S., Sacherer, M., Holzer, M., et al. (2014). Early remodeling of perinuclear  $\text{Ca}^{2+}$  stores and nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling during the development of hypertrophy and heart failure. *Circulation*, 130(3), 244–255. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008927>
- Ljubojevic, S., Walther, S., Asgarzoei, M., Sedej, S., Pieske, B., & Kockskämper, J. (2011). In situ calibration of nucleoplasmic versus cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in adult cardiomyocytes. *Biophysical Journal*, 100(10), 2356–2366. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.060>
- Louch, W. E., Sheehan, K. A., & Wolska, B. M. (2011). Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(3), 288–298. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.06.012>

- Mackenzie, L., Bootman, M. D., Laine, M., Berridge, M. J., Holmes, A., Li, W.-H., & Lipp, P. (2002). The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes, 541(2), 395–409. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013411>
- Maier, L. S., & Bers, D. M. (2002). Calcium, Calmodulin, and Calcium-Calmodulin Kinase II: Heartbeat to Heartbeat and Beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(8), 919–939. <http://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2038>
- Marius, P., Guerra, M. T., Nathanson, M. H., Ehrlich, B. E., & Leite, M. F. (2006). Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 39(1), 65–73. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.09.010>
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., & Marks, A. R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101(4), 365–376. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80847-8](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80847-8)
- Mattiazzi, A., Mundiña-Weilenmann, C., Guoxiang, C., Vittone, L., & Kranias, E. (2005). Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovascular Research*, 68(3), 366–375. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.08.010>
- Molkentin, J. D. (2000). Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circulation Research*, 87(9), 731–738.
- Molkentin, J. D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research*, 63(3), 467–475. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.01.021>
- Moravec, C. S., Reynolds, E. E., Stewart, R. W., & Bond, M. (1989). Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(1), 14–18.
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological Reviews*, 85(4), 1205–1253. <http://doi.org/10.1152/physrev.00002.2005>
- Niggli, E., & Lederer, W. J. (1990). Voltage-independent calcium release in heart muscle. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4980), 565–568.
- Okamoto, K., & Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 27, 282–293.
- Olivares-Florez, S., Czolbe, M., Riediger, F., Seidlmayer, L., Williams, T., Nordbeck, P., et al. (2018). Nuclear calcineurin is a sensor for detecting  $\text{Ca}^{2+}$  release from the nuclear envelope via  $\text{IP}_3\text{R}$ . *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 99, 626–11. <http://doi.org/10.1007/s00109-018-1701-2>
- Paddock, S. W. (2000). Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Molecular Biotechnology*, 16(2), 127–149. <http://doi.org/10.1385/MB:16:2:127>
- Pape, H.-C., Kurtz, A., & Silbernagl, S. (2014). *Physiologie* (7 ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Parys, J. B., Bootman, M. D., Yule, D. I., & Bultynck, G. (2014). *Calcium Techniques: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F. J., Nicol, R. L., McKinsey, T. A., et al. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(10), 1395–1406. <http://doi.org/10.1172/JCI8551>

- Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P., & Yue, D. T. (1999). Calmodulin is the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*, 22(3), 549–558.
- Plackic, J. (2017, February 7). Alterations of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  regulation in ventricular myocytes during development and progression of hypertensive heart disease. Dissertation
- Plackic, J., & Kockskämper, J. (2018). Isolation of Atrial and Ventricular Cardiomyocytes for In Vitro Studies. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1816(2), 39–54. [http://doi.org/10.1007/978-1-4939-8597-5\\_3](http://doi.org/10.1007/978-1-4939-8597-5_3)
- Plackic, J., Preissl, S., Nikonova, Y., Pluteanu, F., Hein, L., & Kockskämper, J. (2016). Enhanced nucleoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in ventricular myocytes from young hypertensive rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 101, 58–68. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.11.001>
- Proven, A., Roderick, H. L., Conway, S. J., Berridge, M. J., Horton, J. K., Capper, S. J., & Bootman, M. D. (2006). Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 16), 3363–3375. <http://doi.org/10.1242/jcs.03073>
- Ríos, E. (2018). Calcium-induced release of calcium in muscle: 50 years of work and the emerging consensus. *The Journal of General Physiology*, 150(4), 521–537. <http://doi.org/10.1085/jgp.201711959>
- Rodriguez, P., Bhogal, M. S., & Colyer, J. (2003). Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38593–38600. <http://doi.org/10.1074/jbc.C301180200>
- Salas, M. A., Vila Petroff, M. G., Palomeque, J., Aiello, E. A., & Mattiazzi, A. (2001). Positive inotropic and negative lusitropic effect of angiotensin II: intracellular mechanisms and second messengers. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(11), 1957–1971. <http://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1460>
- Schlotthauer, K., & Bers, D. M. (2000). Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Circulation Research*, 87(9), 774–780.
- Schmidt, R. F., Lang, F., & Thews, G. (2007). *Physiologie des Menschen* (30 ed.). Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Scriven, D. R. L., & Moore, E. D. W. (2013).  $\text{Ca}^{2+}$  channel and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange localization in cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 58, 22–31. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.022>
- Scriven, D. R. L., Asghari, P., & Moore, E. D. W. (2013). Microarchitecture of the dyad. *Cardiovascular Research*, 98(2), 169–176. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvt025>
- Scriven, D. R. L., Asghari, P., Schulson, M. N., & Moore, E. D. W. (2010). Analysis of Cav1.2 and ryanodine receptor clusters in rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, 99(12), 3923–3929. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.008>
- Sedej, S., Heinzl, F. R., Walther, S., Dybkova, N., Wakula, P., Groborz, J., et al. (2010).  $\text{Na}^+$ -dependent SR  $\text{Ca}^{2+}$  overload induces arrhythmogenic events in mouse cardiomyocytes with a human CPVT mutation. *Cardiovascular Research*, 87(1), 50–59. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvq007>

- Shanks, J., & Herring, N. (2013). Peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in cardiovascular disease: role of neuropeptides. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(12), R1411–20. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00118.2013>
- Shannon, T. R., & Bers, D. M. (1997). Assessment of intra-SR free [Ca] and buffering in rat heart. *Biophysical Journal*, 73(3), 1524–1531. [http://doi.org/10.1016/s0006-3495\(97\)78184-0](http://doi.org/10.1016/s0006-3495(97)78184-0)
- Shannon, T. R., Guo, T., & Bers, D. M. (2003).  $\text{Ca}^{2+}$  scraps: local depletions of free  $[\text{Ca}^{2+}]$  in cardiac sarcoplasmic reticulum during contractions leave substantial  $\text{Ca}^{2+}$  reserve. *Circulation Research*, 93(1), 40–45. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000079967.11815.19>
- Shorofsky, S. R., Aggarwal, R., Corretti, M., Baffa, J. M., Strum, J. M., Al-Seikhan, B. A., et al. (1999). Cellular mechanisms of altered contractility in the hypertrophied heart: big hearts, big sparks. *Circulation Research*, 84(4), 424–434.
- Soeller, C., Jacobs, M. D., Jones, K. T., Ellis-Davies, G. C. R., Donaldson, P. J., & Cannell, M. B. (2003). Application of two-photon flash photolysis to reveal intercellular communication and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  movements. *Journal of Biomedical Optics*, 8(3), 418–427. <http://doi.org/10.1117/1.1582468>
- Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., & Roth, H. J. (2010). *Medizinische Chemie* (2nd ed.). Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- Tadevosyan, A., Vaniotis, G., Allen, B. G., Hébert, T. E., & Nattel, S. (2012). G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *The Journal of Physiology*, 590(6), 1313–1330. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.222794>
- Tomanek, R. J., & Hovanec, J. M. (1981). The effects of long-term pressure-overload and aging on the myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 13(5), 471–488.
- Tomaselli, G. F., & Marbán, E. (1999). Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Research*, 42(2), 270–283.
- Vanecková, I. (2002). Function of the isolated perfused kidney in young and adult spontaneously hypertensive and dahl salt-sensitive rats. *Kidney & Blood Pressure Research*, 25(5), 315–321. <http://doi.org/10.1159/000066791>
- Wang, Z., Nolan, B., Kutschke, W., & Hill, J. A. (2001).  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  Exchanger Remodeling in Pressure Overload Cardiac Hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 17706–17711. <http://doi.org/10.1074/jbc.M100544200>
- Wehrens, X. H. T., & Marks, A. R. (2004). Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(7), 565–573. <http://doi.org/10.1038/nrd1440>
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2004).  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation Research*, 94(6), e61–70. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2>
- Welsch, U., & Deller, T. (2010). *Lehrbuch Histologie* (3rd ed.). München: Urban & Fisher Verlag.
- Wickenden, A. D., Kaprielian, R., Kassiri, Z., Tsoporis, J. N., Tsushima, R., Fishman, G. I., & Backx, P. H. (1998). The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovascular Research*, 37(2), 312–323.

- Wilkins, B. J., Dai, Y.-S., Bueno, O. F., Parsons, S. A., Xu, J., Plank, D. M., et al. (2004). Calcineurin/NFAT Coupling Participates in Pathological, but not Physiological, Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*, 94(1), 110–118. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000109415.17511.18>
- Williams, G. S. B., Boyman, L., Chikando, A. C., Khairallah, R. J., & Lederer, W. J. (2013). Mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26), 10479–10486. <http://doi.org/10.1073/pnas.1300410110>
- Wrzosek, A., Schneider, H., Grueninger, S., & Chiesi, M. (1992). Effect of thapsigargin on cardiac muscle cells. *Cell Calcium*, 13(5), 281–292.
- Wu, A. Z., Xu, D., Yang, N., Lin, S.-F., Chen, P.-S., Cala, S. E., & Chen, Z. (2016). Phospholamban is concentrated in the nuclear envelope of cardiomyocytes and involved in perinuclear/nuclear calcium handling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 100, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.09.008>
- Wu, S. C., Dahl, E. F., Wright, C. D., Cypher, A. L., Healy, C. L., & O'Connell, T. D. (2014). Nuclear Localization of  $\alpha_{1A}$ -Adrenergic Receptors Is Required for Signaling in Cardiac Myocytes: An “Inside-Out”  $\alpha_1$ -AR Signaling Pathway. *Journal of the American Heart Association*, 3(2). <http://doi.org/10.1161/jaha.113.000145>
- Wu, X., & Bers, D. M. (2006a). Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected  $\text{Ca}^{2+}$  store throughout cardiac myocyte. *Circulation Research*, 99(3), 283–291. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000233386.02708.72>
- Wu, X., Zhang, T., Bossuyt, J., Li, X., McKinsey, T. A., Dedman, J. R., et al. (2006b). Local  $\text{InsP}_3$ -dependent perinuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *Circulation Research*, 116(3), 675–682. <http://doi.org/10.1172/JCI27374>
- Xiao, B., Jiang, M. T., Zhao, M., Yang, D., Sutherland, C., Lai, F. A., et al. (2005). Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circulation Research*, 96(8), 847–855. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000163276.26083.e8>
- Yang, Z., & Steele, D. S. (2005). Characteristics of prolonged  $\text{Ca}^{2+}$  release events associated with the nuclei in adult cardiac myocytes. *Circulation Research*, 96(1), 82–90. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000151841.63705.01>
- Zhang, T., & Brown, J. H. (2004). Role of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Research*, 63(3), 476–486. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.04.026>
- Zima, A. V., & Blatter, L. A. (2004). Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. *The Journal of Physiology*, 555(Pt 3), 607–615. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058529>
- Zima, A. V., Bare, D. J., Mignery, G. A., & Blatter, L. A. (2007).  $\text{IP}_3$ -dependent nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in the mammalian heart. *The Journal of Physiology*, 584(Pt 2), 601–611. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.140731>
- Zwadlo, C., & Borlak, J. (2005). Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and  $\text{Ca}^{2+}$ -handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(3), 244–256. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.005>



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Makroskopische Anatomie des Herzens .....	03
Abbildung 1-2	Ultrastruktur der Herzmuskelzelle .....	09
Abbildung 1-3	Elektromechanische Kopplung im Kardiomyozyten .....	11
Abbildung 1-4	Kalzium-abhängige Aktivierung prohypertropher Signalwege im Kardiomyozyten .....	30
Abbildung 2-1	Strukturformel von Isoprenalin .....	38
Abbildung 2-2	Strukturformel von Koffein .....	39
Abbildung 2-3	Thapsia garganica .....	40
Abbildung 2-4	Strukturformel von Thapsigargin .....	41
Abbildung 2-5	Langendorff-System .....	50
Abbildung 2-6	Chemische Struktur und Spektralkurve von Fluo-4 .....	54
Abbildung 2-7	Ester-Beladungsverfahren .....	56
Abbildung 2-8	Prinzip der Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie .....	59
Abbildung 2-9	Zeiss LSM 510 Setup .....	61
Abbildung 2-10	Auswertung der Kalziumtransienten .....	62
Abbildung 3-1	Elektrisch stimulierte CaT bei 1,5 mM und 0,3 mM extrazellulärer Ca-Konzentration .....	67
Abbildung 3-2	Vergleich der CaT bei 1,5 mM und 0,3 mM extrazellulärer Ca-Konzentration .....	68
Abbildung 3-3	Effekte auf cyto- und nucleoplasmatische CaT bei der Stimulation mit Isoprenalin .....	69
Abbildung 3-4	Charakterisierung des Zeitverlaufs des Isoprenalinearffekts .....	71
Abbildung 3-5	Charakterisierung des Isoprenalinearffekts auf die CaT .....	72

Abbildung 3-6	Cyto- und nucleoplasmatische CaT während der SERCA-Hemmung mit Thapsigargin .....	74
Abbildung 3-7	Zeitverlauf des Thapsigargineffekts .....	75
Abbildung 3-8	Charakterisierung des Thapsigargineffekts .....	76
Abbildung 3-9	Kern-Cyto-Diagramme des diastolischen Ca .....	78
Abbildung 3-10	Kern-Cyto-Verhältnisse des diastolischen Ca .....	79
Abbildung 3-11	Kern-Cyto-Diagramme des systolischen Ca .....	81
Abbildung 3-12	Kern-Cyto-Verhältnisse des systolischen Ca .....	82
Abbildung 3-13	Zusammenhang zwischen der Abfallszeitkonstante ( $\tau$ ) und dem Kern-Cyto-Verhältnis .....	84
Abbildung 3-14	Entleerung der intrazellulären Ca-Speicher durch schnelle Koffeinapplikation .....	86
Abbildung 3-15	Charakterisierung der SR- und PN-Ca-Speicherbeladung .....	87
Abbildung 3-16	Charakterisierung der fraktionellen Ca-Freisetzung aus SR- und PN-Ca-Speichern .....	88
Abbildung 3-17	Die Rolle der PN-Ca-Speicherbeladung für die nucleäre Ca-Regulation .....	90
Abbildung 3-18	Vergleich der CaT von SHR- und WKY-Zellen nach dem Matching der Gruppen .....	93
Abbildung 3-19	Charakterisierung des Isoprenalineffekts in SHR-Ventrikeldmyozyten .....	95
Abbildung 3-20	Nucleoplasmatisches versus cytoplasmatisches Ca in SHR-Ventrikeldmyozyten .....	97
Abbildung 3-21	Vergleich der Isoprenalineffekte zwischen SHR und WKY .....	99
Abbildung 4-1	Die nucleäre Ca-Regulation in Ventrikeldmyozyten .....	109



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1	Basispuffer (1 Liter, pH 7,4) .....	43
Tabelle 2-2	Kardioplegie-Lösung .....	44
Tabelle 2-3	Kanülierungslösung .....	44
Tabelle 2-4	Kalziumfreie Lösung .....	45
Tabelle 2-5	Enzymlösung .....	46
Tabelle 2-6	Stopp-Lösung .....	47
Tabelle 2-7	Kalziumlösungen .....	47
Tabelle 2-8	Mess-Tyrode (1 Liter, pH 7,4) .....	57

## Publikationen

### Originalartikel

**Kiess, T.** & Kockskämper, J. (2019). SERCA Activity Controls the Systolic Calcium Increase in the Nucleus of Cardiac Myocytes. *Frontiers in Physiology*, 10, 517. <http://doi.org/10.3389/fphys.2019.00056>

### Kongressbeiträge

**Kiess T**, Plackic J, Kockskämper J. (2016). Modulation of the nuclear calcium handling in ventricular myocytes by stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptors. *Clin Res Cardiol* 105, Suppl 2: BS43. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK); OCT 06-08, 2016; Berlin, DEUTSCHLAND. [Poster]

**Kiess T**, Pluteanu F, Plackic J, Kockskämper J. (2015). Cytoplasmic calcium transients are a major determinant of nucleoplasmic calcium transients in ventricular myocytes. *Clin Res Cardiol* 104, Suppl 2: BS22. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK); OKT 08-10, 2015; Berlin, DEUTSCHLAND. [Poster]

Preisenberger J, Pluteanu F, **Kiess T**, Plackic J, Nikonova Y, Kockskämper J. (2013). Insulin-induced increase of calcium transients is attenuated in ventricular myocytes from Zucker Diabetic Fatty rats. *Clin Res Cardiol* 102, Suppl 2: BS33. Basic Science Meeting der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK); OKT 10, 2013; Dresden, DEUTSCHLAND. [Poster]

Pluteanu F, Wolke C, Bukowska A, **Kiess T**, Sack C, Chilukoti RK, Preisenberger J, Goette A, Lendeckel U, Kockskämper J. (2013). Atrial endothelin-1 signalling in hypertensive rats. *Eur Heart J* 34, (Abstr Suppl): 930. Jahrestagung der European Society of Cardiology (ESC); AUG 31 - SEP 4, 2013; Amsterdam, NIEDERLANDE. [Poster]

Pluteanu F, Wolke C, Bukowska A, **Kiess T**, Galla D, Chilukoti RK, Sack C, Ivanova T, Goette A, Lendeckel U, Kockskämper J. (2013). Augmented endothelin-1 signaling in atrial myocardium from spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica* 207, Suppl 694: O71. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG); MAR 2-5, 2013; Heidelberg, DEUTSCHLAND. [Vortrag]

Pluteanu F, **Kiess T**, Preisenberger J, Kockskämper J. (2013). Characterization of calcium transients in atrial myocytes of type 2 diabetic rats. *Acta Physiologica* 207, Suppl 694: P230. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG); MAR 2-5, 2013; Heidelberg, DEUTSCHLAND. [Poster]

- Pluteanu F, **Kiess T**, Sack C, Nikonova Y, Plackic J, Roderick HL, Kockskämper J. (2012). Endothelin-1 alters calcium transients in atrial myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica* 204, Suppl 689: P017. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG); MAR 22-25, 2012; Dresden, DEUTSCHLAND. [Poster]
- Pluteanu F, Heß J, **Kiess T**, Sachs C, Plackic J, Nikonova Y, Roderick HL, Kockskämper J. (2012). Calcium homeostasis in left atria of hypertensive rats. Jahrestagung der Biophysical Society (BPS), FEB 25-29, 2012; San Diego, USA. [Poster]

## Lebenslauf

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

## **Die Regulation des nucleären Kalziumtransienten in ventrikulären Kardiomyozyten**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 06.03.219